



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis de Doctor en Bioquímica

**ESTUDIO DE LA MOVILIZACIÓN INTRACELULAR
DEL HIERRO Y SU DESREGULACIÓN**

Giorgi Gisela

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis de Doctor en Bioquímica

**ESTUDIO DE LA MOVILIZACIÓN INTRACELULAR
DEL HIERRO Y SU DESREGULACIÓN**

Giorgi Gisela

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2016

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 15 de noviembre 2011 y el 10 de febrero de 2016, bajo la dirección de la Dra. Prof. Marta E. Roque, Profesora Titular de Fisiología Humana.

Giorgi Gisela

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 primer lugar quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Marta Roque, por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación me ha ayudado a realizar este trabajo de tesis; pero sobre todo por el apoyo personal que me ha brindado a lo largo de estos años.

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad Nacional del Sur (UNS) por haberme otorgado las becas doctorales que me permitieron desarrollar este trabajo de tesis. También a la Secretaria General de Ciencia y Tecnología de la UNS, quien financió una estadía de investigación en el exterior, que contribuyó a mi formación profesional y al enriquecimiento del presente trabajo. Agradezco también al departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia por su apoyo.

Un especial agradecimiento quiero mencionar para el Dr. Alejandro Curino y la Dra. María Marta Facchinetti, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme la oportunidad de profundizar mis estudios enriqueciendo este trabajo de tesis. También, a todos los miembros de su laboratorio, especialmente al Dr. Ariel Gandini a quien agradezco su enseñanza y ayuda en cuestiones experimentales.

Al Dr. Marco Tulio Núñez (Universidad de Chile) por recibirme cálidamente en su laboratorio durante dos meses y por brindarme la oportunidad de ampliar mi formación profesional y personal. También agradezco a todos los miembros de su laboratorio, Pamela Urrutia, Pabla Aguirre, Yorka Muñoz, Carlos Carrasco, Victoria Tapia, Andrés Esparza y Carlos Fuentealba, por su gran ayuda en el desarrollo y aprendizaje de nuevas técnicas y con quienes compartí lindos momentos.

A todos mis compañeros del laboratorio y de la cátedra, con los cuales compartí hermosos momentos: Claudio, Florencia, Alejandra, Elizabeth, Marcelo, Daniela y especialmente a Cecilia, por su ayuda incondicional y sus constantes palabras de apoyo.

A mis amigos, que desde lo más profundo de mi corazón les agradezco que siempre han tenido una palabra de ánimo y que han sabido disculpar mis ausencias: Adrián, Belu, Flor, Gime, Gise, Mariano, Nahuel, Leandro y Lucas.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo incondicional de mis padres y mi hermana, quienes siempre me apoyaron y creyeron en mí. Quiero agradecer a mis padres, porque gracias a su amor y enseñanza hoy puedo cumplir un deseo, y a mi hermana, quien me ha enseñado la importancia de luchar por lo que uno quiere.

A Juan, por ser una ayuda clave para que este trabajo llegara a buen puerto, estando incondicionalmente a mi lado en los buenos y malos momentos, animándome siempre a continuar. Le agradezco por todos los esfuerzos que ha hecho para comprenderme y por haberme hecho creer que podía hacerlo.

RESUMEN

En este trabajo de tesis se estudió la fisiología y fisiopatología del metabolismo del hierro. En células hepáticas, duodenales, renales, pancreáticas, pulmonares y neuronales se evaluaron proteínas que movilizan hierro a través de las membranas celulares en estados de balance de hierro y sus cambios regulatorios en la dishomeostasis del biometal. Se utilizaron Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro y una línea celular de neuroblastoma humano para el estudio de las proteínas importadoras de hierro Transportador de Metales Divalentes 1 (DMT1), ZIP14 (SLC39A14) y Receptor de Transferrina 1 (RTf1); las proteínas reguladoras Proteína de la Hemocromatosis (HFE), Proteína Reguladora del Hierro 1 (IRP1) y Prohepcidina; la proteína exportadora Ferroportina (FPN) y la proteína de depósito Ferritina. Metodologías: histoquímica, inmunohistoquímica y técnicas de biología molecular (EMSA, *Western blot* y RT-PCR). Se desarrollaron: **1)** Modelos Animales Murinos (ratones CF1; n=6/grupo): a) Sobrecarga de Hierro: hierro sacarato; control (solución fisiológica); b) Deficiencia de Hierro: flebotomía; control (operación simulada); **2)** Células SH-SY5Y con/sin N-acetilcisteína y células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1 fueron tratadas con IL-6, TNF- α , LPS y solución salina. *Deficiencia de Hierro:* la expresión apical de DMT1 en enterocitos y su débil expresión en hepatocitos mostraron un mecanismo que estimula la absorción de hierro de la dieta y disminuye la captación hepática. La expresión apical de DMT1 y RTf1 y la débil expresión de Prohepcidina en células tubulares proximales renales evidencian aumento de la captación renal de hierro en coordinación con duodeno. El aumento de RTf1 y la localización apical de DMT1, HFE y FPN en las células bronquiales les adjudican a estas proteínas funciones en la captación y en el control de hierro para suministrar hierro al pulmón. Prohepcidina pulmonar no regularía la movilización del hierro en pulmón en deficiencia. *Sobrecarga de hierro:* la localización perinuclear de DMT1 en enterocitos y su intensa expresión en hepatocitos mostraron un mecanismo regulatorio que limita la absorción de hierro de la dieta y aumenta su captación hepática. El aumento de ZIP14 y su localización apical en células proximales evidencian una mayor reabsorción renal de hierro que produce sobrecarga de hierro en el riñón, mecanismo que predomina sobre la función de DMT1 y RTf1. El aumento de ZIP14 y FPN y la localización apical de DMT1 y Ferritina en las células bronquiales les adjudican a estas proteínas funciones en la captación, exportación y almacenamiento de hierro para

detoxificar el exceso de hierro. Prohepcidina pulmonar no regularía la movilización del exceso de hierro en pulmón. La disminución de DMT1 y Ferritina y el aumento de Prohepcidina en las células del islote de Langerhans mostraron un mecanismo que limitaría la acumulación del hierro en las células endocrinas, siendo las células de reserva de hierro las del acino y del tejido conectivo. *Modelo de Inflamación:* el aumento de DMT1 en las células SH-SY5Y inducido por citoquinas y LPS le adjudica a DMT1 una función en la captación de hierro. El aumento de DMT1 sería controlado principalmente por una regulación transcripcional mediada por ROS. La activación de IRP1 independiente de ROS no sería un mecanismo regulatorio predominante sobre el aumento de DMT1 en inflamación. El empleo del antioxidante NAC revierte el efecto de la inflamación sobre el aumento de DMT1, por lo que NAC podría disminuir la captación de hierro en células de neuroblastoma. Finalmente podemos concluir que en Deficiencia de Hierro existen mecanismos regulatorios de las proteínas del hierro en duodeno, hígado, riñón y pulmón que suministran el hierro tisular o sistémico requerido en alta demanda. En Sobrecarga de Hierro, la regulación de las proteínas en duodeno e hígado disminuiría el hierro biodisponible. En pulmón y páncreas, las proteínas del hierro participarían de un mecanismo beneficioso para limitar el daño oxidativo de las células del pulmón y del páncreas endocrino en Sobrecarga de Hierro. En cambio, en el riñón, la regulación de ZIP14 originaría la sobrecarga de hierro en los túbulos proximales que induciría daño celular. En Inflamación DMT1 contribuiría a la captación de hierro libre en las células neuronales a través de una regulación principalmente transcripcional mediada por ROS, siendo esta función de DMT1 revertida por el agregado de antioxidantes. En conclusión, la relación entre las proteínas del hierro en diferentes células en modelos animales puede ayudar a comprender mejor los mecanismos implicados en la fisiología y fisiopatología del metabolismo del hierro.

ABSTRACT

The purpose of this Ph. D. thesis was to study the physiology and physiopathology of iron metabolism. To this end, proteins that mobilize iron across cell membranes in states of iron balance as well as their regulatory changes in the dishomeostasis of this biometal were analyzed in liver, duodenal, kidney, pancreatic, lung and neural cells. Animal Models of Iron Overload and of Iron Deficiency as well as a human neuroblastoma cell line were used to study iron import proteins Divalent Metal Transporter 1 (DMT1), ZIP14 (SLC39A14) and Transferrin Receptor 1 (RTf1); regulators proteins Hemochromatosis Protein (HFE), Iron Regulatory Protein 1 (IRP1) and Prohepcidin; export protein Ferroportin (FPN) and storage protein Ferritin. Methodologies: histochemistry, immunohistochemistry and molecular biology techniques (EMSA, Western blot and RT-PCR). The following were developed: **1)** Murine Animal Models (CF1 mice; n=6/group): a) Iron Overload: iron saccharate, control (physiological solution), b) Iron Deficiency: phlebotomy, control (sham-operated); **2)** SH-SY5Y cells with/without N-acetylcysteine and SH-SY5Y *knockdown* cells for IRP1 were treated with IL-6, TNF- α , LPS and saline solution. *Iron Deficiency*: the apical expression of DMT1 in enterocytes and its weak expression in hepatocytes revealed a mechanism which stimulates iron absorption from the diet and reduces liver uptake. The apical expression of DMT1 and RTf1 as well as the weak expression of Prohepcidin in renal proximal tubular cells were observed to evidence an iron uptake increase in coordination with the duodenum. The increase in RTf1 as well as the apical localization of DMT1, HFE and FPN in bronchial cells were found to be indicative of proper functions of these proteins of iron uptake and control to supply iron to the lungs. Pulmonary Prohepcidin seemed not regulate iron mobilization in the lung under deficiency conditions. *Iron overload*: perinuclear DMT1 localization in enterocytes as well as its intense expression in hepatocytes were found to be indicative of a regulatory mechanism that restricts dietary iron absorption but increases its hepatic uptake. ZIP14 increase and its apical localization in proximal cells were observed to show a higher renal iron reabsorption producing, in turn, iron overload in the kidney, this being a mechanism that predominates over DMT1 and RTf1 function. ZIP14 and FPN increase and DMT1 and Ferritin apical localization in bronchial cells were observed to confer these proteins functions in iron uptake, export and storage for iron excess detoxification. Pulmonary Prohepcidin seemed not to regulate iron excess mobilization in the lung. DMT1

and Ferritin decrease and Prohepcidin increase in the islet of Langerhans cells revealed a mechanism which appeared to restrict iron accumulation in endocrine cells, iron reserve cells being those of the acinus and connective tissue. *Model of Inflammation:* cytokine- and LPS-induced increase of DMT1 in SH-SY5Y cells was found to confer DMT1 an iron uptake function. DMT1 increase could be controlled mainly by a ROS-mediated transcriptional regulatory mechanism. ROS-independent IRP1 activation seemed not to behave as a predominant regulatory mechanism over DMT1 increase under inflammation conditions. The use of NAC antioxidant was found to reverse the effect of inflammation on DMT1 increase, this being the reason why NAC could reduce iron uptake in neuroblastoma cells. Taken together, results from this Ph. D. thesis lead us to conclude that under Iron Deficiency conditions iron-protein regulatory mechanisms supply highly required tissular or systemic iron in duodenum, liver, kidney and lung. Under Iron Overload conditions, protein regulation seems to reduce bioavailable iron in duodenum and liver. In the lung and pancreas, iron proteins may be part of a beneficial mechanism to reduce the oxidative damage of lung cells and endocrine pancreas under Iron Overload conditions. In contrast, in the kidney, ZIP14 regulation seems to give rise to Iron Overload in proximal tubules, thus inducing cell damage. Under Inflammation conditions, DMT1 appears to contribute to the uptake of iron-free in neuronal cells mainly through a ROS-mediated transcriptional regulatory mechanism, this particular function of DMT1 being reversed by the addition of antioxidants. In conclusion, the relationship between the iron proteins in different cells in animal models may help to better understand the mechanisms involved in the physiology and pathophysiology of iron metabolism.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN	21
MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. Animales de experimentación	54
1.1. Cepa de ratones	54
1.2. Aprobación ética	54
1.3. Dietas y condiciones ambientales.....	54
1.4. Métodos de extracción sanguínea	55
1.4.1. Anestesia.....	55
1.4.2. Extracción del plexo submandibular	55
1.4.3. Extracción del seno retro-orbital.....	56
1.5. Disección de tejidos	56
1.5.1. Eutanasia y necropsia	56
1.6. Vías de administración de sustancias	57
2. Modelos <i>in vivo</i>	57
2.1. Modelo de Sobrecarga de hierro	57
2.2. Modelo de Deficiencia de hierro	58
3. Modelos <i>in vitro</i>	58
3.1. Células SH-SY5Y	58
3.2. Células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1 (Clon 9)	58

3.3. Condiciones de cultivo	59
3.4. Protocolos experimentales	59
3.4.1. Tratamientos de células SH-SY5Y con estímulos inflamatorios y con N-acetilcisteína.....	59
3.4.2. Tratamientos de células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1 con estímulos inflamatorios	59
4. Parámetros hematológicos y bioquímicos.....	60
4.1. Hematocrito	60
4.2. Hemoglobina.....	60
4.3. Reticulocitos.....	61
5. Determinación del estado del hierro	61
5.1. Hierro plasmático	61
5.2. Hierro tisular	62
5.2.1. Evaluación cuantitativa	62
5.2.2. Evaluación cualitativa.....	62
6. Estudios morfológicos en tejidos	63
6.1. Caracterización e identificación de los segmentos del túbulo proximal en el riñón .	63
7. Anticuerpos	64
7.1. Anticuerpos primarios	64
7.2. Anticuerpos secundarios	65
8. Inmunohistoquímica	65
8.1. Fundamento	65
8.2. Procedimiento experimental	66
8.2.1. Procesamiento de tejidos	66
8.2.1.1. Fijación	66

8.2.1.2. Inclusión y cortes del material en micrótopo	66
8.2.2. Inmunodetección	66
9. Técnica de doble tinción	68
9.1. Fundamento	68
9.2. Procedimiento experimental	68
10. Western blot	69
10.1. Fundamento	69
10.2. Procedimiento experimental	69
10.2.1. Preparación de homogenados	69
10.2.1.1. Homogenados tisulares	69
10.2.1.2. Homogenados celulares	70
10.2.2. Cuantificación de proteínas	70
10.2.2.1. Ácido bicinonínico	70
10.2.2.2. Bradford	70
10.2.3. Electroforesis de proteínas	71
10.2.4. Transferencia de proteínas	71
10.2.5. Bloqueo de uniones inespecíficas	72
10.2.6. Inmunodetección	72
10.2.7. Reutilización de membranas	73
11. Ensayo de cambio de movilidad electroforética	73
11.1. Fundamento	73
11.2. Procedimiento experimental	73
11.2.1. Preparación de homogenados	73
11.2.2. Cuantificación de proteínas	74
11.2.3. Gel de Acrilamida	74
11.2.4. Preparación de las muestras	74

11.2.5. Electroforesis.....	74
11.2.6. Transferencia de proteínas	75
11.2.7. Crosslinking con radiación ultravioleta	75
11.2.8. Detección	75
12. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	75
12.1. Fundamento	75
12.2. Procedimiento experimental	76
13. Reacción en cadena de la polimerasa	76
13.1. Fundamento	76
13.2. Procedimiento experimental	77
13.2.1. Método de extracción	77
13.2.2. Obtención de ADN complementario	78
13.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa	78
13.2.4. Separación y detección de los fragmentos amplificados	79
14. Bioestadística	79
14.1. Diseño experimental pareado	79
14.2. Determinación del tamaño de muestra	80
14.3. Análisis estadístico	81
14.3.1. Test <i>t-sudent</i> para muestras pareadas	81
14.3.2. Análisis de Varianza	82
14.3.3. Comparaciones múltiples	82
RESULTADOS.....	84
Capítulo 1: Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro. Evaluación de la eritropoyesis y de la ferremia	85
1.1. Modelo de Sobrecarga de Hierro	86
1.1.1. Diseño experimental	86

1.1.2. Resultados.....	87
1.1.2.1. Estudios hematológicos.....	87
1.1.2.2. Estudio del hierro plasmático	87
1.2. Modelo de Deficiencia de Hierro	88
1.2.1. Diseño experimental	88
1.2.2. Resultados.....	89
1.2.2.1. Estudios hematológicos.....	89
1.2.2.2. Estudio del hierro plasmático	90
Capítulo 2: Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro. Caracterización de las proteínas del hierro y su regulación en hígado y duodeno	91
2.1. Introducción.....	92
2.2. Descripción estructural y funcional del duodeno, hígado y bazo	92
2.3. Resultados.....	96
2.3.1. Modelo de Sobrecarga de Hierro.....	96
2.3.1.1. Estado del hierro hepático y esplénico	96
2.3.1.1.1. Estudio cuantitativo del hierro	96
2.3.1.1.2. Estudio cualitativo del hierro	96
2.3.1.2. Transportador de metales divalentes 1 duodenal y hepático	98
2.3.1.2.1. Duodeno	98
2.3.1.2.2. Hígado	99
2.3.1.3. Transportador ZIP14 hepático.....	100
2.3.1.4. Prohepcidina hepática.....	101
2.3.1.5. L-ferritina hepática	102
2.3.2. Modelo de Deficiencia de Hierro	103
2.3.2.1. Estado del hierro hepático y esplénico	103

2.3.2.1.1. Estudio cuantitativo del hierro	103
2.3.2.1.2. Estudio cualitativo del hierro	104
2.3.2.2. Transportador de metales divalentes 1 duodenal y hepático	105
2.3.2.2.1. Duodeno	105
2.3.2.2.2. Hígado	105
2.3.2.3. L-ferritina hepática	106
Capítulo 3: Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro. Caracterización de las proteínas del hierro y su regulación en páncreas	108
3.1. Introducción.....	109
3.2. Descripción estructural y funcional del páncreas.....	109
3.3. Resultados.....	112
3.3.1. Estado del hierro pancreático	112
3.3.1.1 Estudio cuantitativo del hierro	112
2.3.1.2. Estudio cualitativo del hierro	112
3.3.2. Transportador de metales divalentes 1 pancreático.....	113
3.3.3. Prohepcidina pancreática	115
3.3.4. L-ferritina pancreática.....	115
Capítulo 4: Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro. Caracterización de las proteínas del hierro y su regulación en riñón	117
4.1. Introducción.....	118
4.2. Descripción estructural y funcional del riñón.....	118
4.3. Resultados.....	120
4.3.1. Modelo de Sobrecarga de Hierro.....	120
4.3.1.1. Estado del hierro renal	120
4.3.1.1.1. Estudio cuantitativo del hierro	120

4.3.1.1.2. Estudio cualitativo del hierro	121
4.3.1.2. Transportador de metales divalentes 1 renal.....	122
4.3.1.3. Receptor de transferrina 1 renal.....	125
4.3.1.4. ZIP14 renal	127
4.3.1.5. Prohepcidina renal	130
4.3.1.6. L-ferritina renal	132
4.3.2. Modelo de Deficiencia de Hierro	134
4.3.2.1. Estado del hierro renal	134
4.3.2.1.1. Estudio cuantitativo del hierro	134
4.3.2.1.2. Estudio cualitativo del hierro	134
4.3.2.2. Transportador de metales divalentes 1 renal.....	135
4.3.2.3. Receptor de transferrina 1 renal.....	137
4.3.2.4. Prohepcidina renal	139
Capítulo 5: Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro. Caracterización de las proteínas del hierro y su regulación en pulmón	141
5.1. Introducción.....	142
5.2. Descripción estructural y funcional del pulmón.....	142
5.3. Resultados.....	144
5.3.1. Modelo de Sobrecarga de Hierro.....	144
5.3.1.1. Estado del hierro pulmonar	144
5.3.1.1.1. Estudio cuantitativo del hierro	144
5.3.1.1.2. Estudio cualitativo del hierro	144
5.3.1.2. Transportador ZIP14 pulmonar.....	145
5.3.1.3. Transportador de metales divalentes 1 pulmonar	147
5.3.1.4. Receptor de transferrina 1 pulmonar	148

5.3.1.5. Ferroportina pulmonar	149
5.3.1.6. Prohepcidina pulmonar	151
5.3.1.7. L-ferritina pulmonar	151
5.3.2. Modelo de Deficiencia de Hierro	152
5.3.2.1. Estado del hierro pulmonar	152
5.3.2.1.1. Estudio cuantitativo del hierro	152
5.3.2.1.2. Estudio cualitativo del hierro	153
5.3.2.2. Transportador ZIP14 pulmonar.....	154
5.3.2.3. Transportador de metales divalentes 1 pulmonar	155
5.3.2.4. Receptor de transferrina 1 pulmonar	157
5.3.2.5. Ferroportina pulmonar	157
5.3.2.6. Proteína de la hemocromatosis pulmonar	159
5.3.2.7. Prohepcidina pulmonar	160
5.3.2.8. L-ferritina pulmonar.....	161

Capítulo 6: Sistema celular de Neuroblastoma Humano. Caracterización de las proteínas del hierro y su regulación en inflamación por estrés oxidativo	162
6.1. Introducción.....	163
6.2. Modelo de inflamación en células SH-SY5Y.....	163
6.2.1. Descripción del modelo	163
6.2.2. Resultados	164
6.2.2.1. Regulación de IRP1 en células SH-SY5Y	164
6.2.2.2. Regulación de DMT1 en células SH-SY5Y	167
6.2.2.3. Regulación de RTf1 en células SH-SY5Y	168
6.2.2.4. Regulación de ferritina en células SH-SY5Y	169
6.3. Modelo de inflamación en células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1.....	170

6.3.1. Descripción del modelo	170
6.3.2. Resultados	171
6.3.2.1. Regulación de IRP 1 en células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1.....	171
6.3.2.2. Regulación de DMT1 en células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1	173
6.3.2.3. Regulación de RTf1 en células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1.....	175
6.3.2.4. Regulación de ferritina en células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1.....	176
DISCUSIÓN	178
Capítulo 1: Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro. Evaluación de la eritropoyesis y de la ferremia	179
El ratón como Modelo Biológico	180
Aspectos Bioéticos para el empleo de Animales de Laboratorio como Modelo Biológico	180
Estudios hematológicos y estado del hierro circulante en Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro	182
Capítulo 2: Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro. Caracterización de las proteínas del hierro y su regulación en hígado y duodeno	184
Modelo de Sobrecarga de Hierro	185
Transportador de metales divalentes 1 duodenal.....	185
Prohepcidina hepática	186
Transportador de metales divalentes 1 y ZIP14 hepáticos.....	188
Ferritina hepática	190
Conclusiones	190
Modelo de Deficiencia de Hierro	192
Transportador de metales divalentes 1 duodenal.....	192
Transportador de metales divalentes 1 hepático	192
Ferritina hepática	193
Conclusiones	194

Capítulo 3: Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro. Caracterización de las proteínas del hierro y su regulación en páncreas	195
Transportador de metales divalentes 1 pancreático	196
Prohepcidina pancreática	197
Ferritina y hemosiderina pancreáticas.....	199
Conclusiones	200
Capítulo 4: Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro. Caracterización de las proteínas del hierro y su regulación en riñón	202
Modelo de Sobrecarga de Hierro	204
Receptor de transferrina 1 renal.....	204
Transportador de metales divalentes 1 renal.....	205
ZIP14 renal	207
Prohepcidina renal	208
Conclusiones	209
Modelo de Deficiencia de Hierro	211
Receptor de transferrina 1 renal.....	211
Transportador de metales divalentes 1 renal.....	212
Prohepcidina renal	213
Conclusiones	214
Capítulo 5: Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro. Caracterización de las proteínas del hierro y su regulación en pulmón	216
Modelo de Sobrecarga de Hierro	217
Zip14 pulmonar	217
Transportador de metales divalentes 1 pulmonar	218
Receptor de transferrina 1 pulmonar	219
Ferroportina pulmonar	220

Ferritina pulmonar	221
Prohepcidina pulmonar.....	221
Conclusiones	222
Modelo de Deficiencia de Hierro	223
Zip14 pulmonar	224
Transportador de metales divalentes 1 pulmonar	225
Receptor de transferrina 1 pulmonar	225
Ferroportina pulmonar	226
Proteína de la hemocromatosis pulmonar	226
Prohepcidina pulmonar.....	227
Conclusiones	228
Capítulo 6: Sistema celular de Neuroblastoma Humano. Caracterización de las proteínas del hierro y su regulación en inflamación por estrés oxidativo	230
Regulación de la proteína reguladora del hierro 1	232
Regulación del transportador de metales divalentes 1	233
Regulación del receptor de transferrina 1	235
Regulación de ferritina	235
Conclusiones	237
CONCLUSIONES FINALES	239
REFERENCIAS	240
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	261

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios: diluciones y tiempos de incubación.....	64
Tabla 2. Anticuerpos secundarios: diluciones y tiempos de incubación.....	65
Tabla 3. Tiempos de revelado según el tejido y el anticuerpo	67
Tabla 4. Lista de <i>primers</i> utilizados	78
Tabla 5. Programas de amplificación	79
Figura 1. Esquema representativo del ciclo del hierro.....	23
Figura 2. Mecanismos de absorción duodenal de hierro	27
Figura 3. Mecanismos de movilización del hierro en hepatocitos	30
Figura 4. Esquema representativo de la regulación de hepcidina hepática por hierro	37
Figura 5. Esquema representativo de las vías nuevas propuestas para la regulación de hepcidina hepática mediadas por hierro	39
Figura 6. Esquema representativo de la regulación de hepcidina hepática por hipoxia y eritropoyesis	42
Figura 7. Mecanismo de regulación traduccional mediado por el sistema IRE/IRP.....	46
Figura 8. Localización del plexo submandibular.....	55
Figura 9. Esquema del diseño experimental del Modelo de Sobrecarga de Hierro	86
Figura 10. Hemoglobina y hematocrito en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	87
Figura 11. Hierro plasmático en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	87
Figura 12. Esquema del diseño experimental del Modelo de Deficiencia de Hierro	88
Figura 13. Hemoglobina, hematocrito y reticulocitos en el Modelo de Deficiencia de Hierro	89
Figura 14. Hierro plasmático en el Modelo de Deficiencia de Hierro	90

Figura 15. Diagrama esquemático del duodeno	93
Figura 16. Diagrama esquemático del hígado	94
Figura 17. Diagrama esquemático del bazo	95
Figura 18. Hierro hepático y esplénico en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	96
Figura 19. Hemosiderina en bazo en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	97
Figura 20. Hemosiderina en hígado en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	97
Figura 21. Inmunolocalización de DMT1 en duodeno en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	98
Figura 22. Control negativo del tejido duodenal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	99
Figura 23. <i>Western blot</i> de DMT1 duodenal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	99
Figura 24. Inmunolocalización de DMT1 en hígado en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	100
Figura 25. Control negativo del tejido hepático en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	100
Figura 26. Inmunolocalización de ZIP14 en hígado en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	101
Figura 27. Inmunolocalización de prohepcidina en hígado en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	102
Figura 28. Inmunolocalización de L-ferritina en hígado en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	103
Figura 29. Hierro hepático y esplénico en el Modelo de Deficiencia de Hierro	103
Figura 30. Hemosiderina en bazo en el Modelo de Deficiencia de Hierro	104
Figura 31. Hemosiderina en hígado en el Modelo de Deficiencia de Hierro	104
Figura 32. Inmunolocalización de DMT1 en duodeno en el Modelo de Deficiencia de Hierro	105
Figura 33. Control negativo del tejido duodenal en el Modelo de Deficiencia de Hierro	105
Figura 34. Inmunolocalización de DMT1 en el Modelo de Deficiencia de Hierro	106
Figura 35. Control negativo del tejido hepático en el Modelo de Deficiencia de Hierro	106

Figura 36. Inmunolocalización de L-ferritina en hígado en el Modelo de Deficiencia de Hierro	107
Figura 37. Diagrama esquemático del páncreas	111
Figura 38. Hierro pancreático en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	112
Figura 39. Hemosiderina en páncreas en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	113
Figura 40. Inmunolocalización de DMT1 en páncreas en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	114
Figura 41. Control negativo del tejido pancreático en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	114
Figura 42. <i>Western blot</i> de DMT1 pancreático en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	114
Figura 43. Inmunolocalización de prohepcidina en páncreas en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	115
Figura 44. Inmunolocalización de L-ferritina en páncreas en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	116
Figura 45. Diagrama esquemático del riñón	120
Figura 46. Hierro renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	120
Figura 47. Hemosiderina en corteza renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	121
Figura 48. Hemosiderina en médula renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	122
Figura 49. Inmunolocalización de DMT1 en corteza renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	123
Figura 50. Inmunolocalización de DMT1 en médula renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	124
Figura 51. Control negativo del tejido renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	124
Figura 52. <i>Western blot</i> de DMT1 renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	125
Figura 53. Inmunolocalización de RTf1 en corteza renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	126
Figura 54. Inmunolocalización de RTf1 en médula renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	127

Figura 55. Inmunolocalización de ZIP14 en corteza renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	128
Figura 56. Inmunolocalización de ZIP14 en médula renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	129
Figura 57. <i>Western blot</i> de ZIP14 renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	130
Figura 58. Inmunolocalización de prohepcidina en corteza renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	131
Figura 59. Inmunolocalización de prohepcidina en médula renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	132
Figura 60. Inmunolocalización de L-ferritina en corteza renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	133
Figura 61. Inmunolocalización de L-ferritina en médula renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	133
Figura 62. Hierro renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro	134
Figura 63. Hemosiderina en el tejido renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro	135
Figura 64. Inmunolocalización de DMT1 corteza renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro	136
Figura 65. Inmunolocalización de DMT1 médula renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro	137
Figura 66. Control negativo del tejido renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro	137
Figura 67. Inmunolocalización de RTf1 en corteza renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro	138
Figura 68. Inmunolocalización de RTf1 en médula renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro	139
Figura 69. Inmunolocalización de prohepcidina en corteza renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro	140
Figura 70. Inmunolocalización de prohepcidina en médula renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro	140

Figura 71. Diagrama esquemático del pulmón	143
Figura 72. Hierro pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	144
Figura 73. Hemosiderina en pulmón en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	145
Figura 74. Inmunolocalización de ZIP14 en pulmón en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	146
Figura 75. Control negativo del tejido pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de Hierro ...	146
Figura 76. <i>Western blot</i> de ZIP14 pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	146
Figura 77. Inmunolocalización de DMT1 en pulmón en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	147
Figura 78. Control negativo del tejido pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de Hierro ...	148
Figura 79. <i>Western blot</i> de DMT1 pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	148
Figura 80. <i>Western blot</i> de RTf1 pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	149
Figura 81. Inmunolocalización de FPN en pulmón en el Modelo de Sobrecarga de Hierro .	150
Figura 82. <i>Western blot</i> de FPN pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	150
Figura 83. Inmunolocalización de prohepcidina en pulmón en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	151
Figura 84. Inmunolocalización de L-ferritina en pulmón en el Modelo de Sobrecarga de Hierro	152
Figura 85. Hierro pulmonar en el Modelo de Deficiencia de Hierro	153
Figura 86. Hemosiderina en pulmón en el Modelo de Deficiencia de Hierro	153
Figura 87. Inmunolocalización de ZIP14 en pulmón en el Modelo de Deficiencia de Hierro	154
Figura 88. Control negativo del tejido pulmonar en el Modelo de Deficiencia de Hierro ...	154
Figura 89. <i>Western blot</i> de ZIP14 pulmonar en el Modelo de Deficiencia de Hierro	155
Figura 90. Inmunolocalización de DMT1 en pulmón en el Modelo de Deficiencia de Hierro	156

Figura 91. <i>Western blot</i> de DMT1 pulmonar en el Modelo de Deficiencia de Hierro	156
Figura 92. <i>Western blot</i> de RTf1 pulmonar en el Modelo de Deficiencia de Hierro	157
Figura 93. Inmunolocalización de FPN en pulmón en el Modelo de Deficiencia de Hierro .	158
Figura 94. <i>Western blot</i> de FPN pulmonar en el Modelo de Deficiencia de Hierro	158
Figura 95. Inmunolocalización de HFE en el Modelo de Deficiencia de Hierro	159
Figura 96. <i>Western blot</i> de HFE pulmonar en el Modelo de Deficiencia de Hierro	160
Figura 97. Inmunolocalización de prohepcidina en el Modelo de Deficiencia de Hierro	160
Figura 98. Inmunolocalización de L-ferritina en el Modelo de Deficiencia de Hierro	161
Figura 99. Esquema del Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y	164
Figura 100. <i>Western blot</i> de IRP1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y	166
Figura 101. Actividad de IRP1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y	166
Figura 102. <i>Western blot</i> de DMT1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y	167
Figura 103. <i>Western blot</i> de RTf1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y	168
Figura 104. Niveles de ferritina n el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y.....	169
Figura 105. Esquema del Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1	170
Figura 106. <i>Western blot</i> de IRP1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1.....	172
Figura 107. RT-PCR de IRP1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1	172
Figura 108. Actividad de IRP1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1.....	173
Figura 109. <i>Western blot</i> de DMT1 en el Modelo de inflamación en células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1.....	174
Figura 110. RT-PCR de DMT1 IRE y no IRE en el Modelo de inflamación en células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1.....	175

Figura 111. <i>Western blot</i> de RTf1 en el Modelo de inflamación en células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1.....	176
Figura 112. Niveles de ferritina en el Modelo de inflamación en células SH-SY5Y <i>knockdown</i> para IRP1.....	177
Figura 113. Vía propuesta para limitar el hierro biodisponible en Sobrecarga de Hierro.	191
Figura 114. Vía propuesta para aumentar el hierro biodisponible en Deficiencia de Hierro	194
Figura 115. Vía propuesta para limitar la acumulación de hierro en el páncreas endocrino en Sobrecarga de Hierro	201
Figura 116. Vía propuesta para aumentar la acumulación de hierro en la corteza renal en Sobrecarga de Hierro y Vía propuesta para limitar la acumulación de hierro en la médula interna renal en Sobrecarga de Hierro.	210
Figura 117. Vía propuesta para aumentar la captación de hierro en la corteza renal en Deficiencia de Hierro y Vía propuesta para aumentar la captación de hierro en la médula interna renal en Deficiencia de Hierro	215
Figura 118. Vía propuesta para detoxificar en el hierro en exceso en Sobrecarga de Hierro	223
Figura 119. Vía propuesta para suministrar hierro al pulmón en Deficiencia de Hierro	239
Figura 120. Vía propuesta para la regulación de las proteínas del hierro en células de neuroblastoma en Inflamación	238

ABREVIATURAS

ABCG2	<i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BMP	Proteína morfogenética ósea
Cp	Ceruloplasmina
DAB	Diaminobencidina
DcytB	Ferrireductasa citocromo B duodenal
DMT1	Transportador de metales divalentes 1
ELISA	Enzimoinmunoanálisis
EPO	Eritropoyetina
Fe ²⁺	Hierro ferroso
Fe ³⁺	Hierro férrico
FLVCR	<i>feline leukemia virus subgroup C receptor</i>
FPN	Ferroportina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido Clorhídrico
HCP1	<i>Heme carrier protein 1</i>
HCT	Hematocrito
HFE	Proteína de la hemocromatosis
HIF	Factor inducible por hipoxia
HJV	Hemojuvelina
HO-1	Hemo oxigenasa 1
HO-2	Hemo oxigenasa 2
HRE	Elemento de respuesta a la hipoxia
HRP	Peroxidasa de rábano
i.p.	Intraperitoneal
IL-6	Interleukina 6
IRE	Elemento de respuesta al hierro
IRP	Proteína de respuesta al hierro
kDa	Kilodaltons
LPS	Lipopolisacárido
n	Número de unidades experimentales
NaCl	Cloruro de Sodio
NF κβ	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
Nrf 2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor</i>
NTBI	Hierro no unido a transferrina
PBS	Buffer fosfato salino
ROS	Sustancias reactivas del oxígeno
RTf1	Receptor de transferrina 1
RTf2	Receptor de transferrina 2

SD	Desvío estándar
SDS	Sodio dodecil sulfato
SF	Solución fisiológica
SMADs	<i>Sma and mothers against decapentaplegic homologue</i>
TBI	Hierro unido a transferrina
Tf	Transferrina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
ZIP14	<i>ZRT Irt-like protein 14</i>

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES

El hierro es un nutriente esencial para la supervivencia celular, debido a que participa en procesos metabólicos energéticos y oxidativos en la mayoría de los organismos (Ganz & Nemeth, 2006). El hierro tiene la capacidad de aceptar y donar electrones fácilmente a través de su conversión entre la forma oxidada (Fe^{3+}) y la forma reducida (Fe^{2+}). Esta característica le permite formar parte de diversas hemo-proteínas como la hemoglobina y numerosas enzimas involucradas en reacciones redox y en el metabolismo energético (Pérez et al., 2005).

El hierro total del organismo es de 3-4 g/ Kg de peso corporal y se distribuye principalmente en el compartimento funcional y el de reserva. El compartimento funcional posee del 70% al 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).

Un aspecto importante a destacar es que el hierro libre es tóxico porque cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno a radicales libres que dañan las membranas celulares, proteínas y ADN (Gutteridge et al., 1982). Por ello, la biodisponibilidad del hierro es estrictamente regulada a través de mecanismos celulares y sistémicos que controlan la absorción, depósito y reutilización del hierro (Ganz & Nemeth, 2006).

En cuanto al proceso de excreción del hierro se ha descrito que los mamíferos no poseen mecanismos regulatorios que lo controlen, siendo eliminado del cuerpo a través del desprendimiento de células de las mucosas y de la piel. Para reemplazar estas pérdidas basales de hierro y mantener el balance del biometal, el organismo incorpora de la dieta una cantidad aproximadamente equivalente de hierro a través de la absorción duodenal (Ganz & Nemeth, 2006). 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 (Figura 1). El hierro requerido para la producción de eritrocitos proviene principalmente del reciclado de hierro de los

glóbulos rojos senescentes, proceso que es realizado por los macrófagos del sistema retículo endotelial (SRE) (Knutson & Wessling-Resnick, 2003).

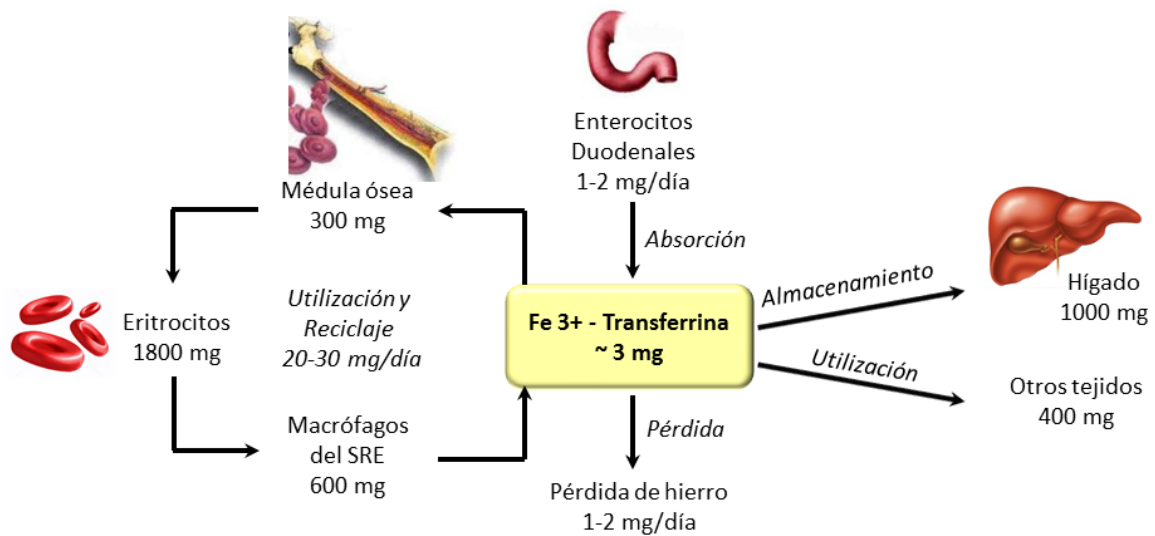


Figura 1. Esquema representativo del ciclo del hierro.

Estos procesos celulares y sistémicos son llevados a cabo y controlados por una compleja red de proteínas que regulan y movilizan el hierro a través de las membranas celulares para coordinar los procesos de absorción, distribución, reciclado y almacenamiento de hierro según la demanda del organismo.

2. ABSORCIÓN DUODENAL DE HIERRO

La porción duodenal del intestino delgado es el principal segmento del tracto gastrointestinal donde se produce la absorción de hierro de la dieta (Frazer & Anderson, 2005). El hierro puede ser absorbido de la dieta en forma de hierro no hemo, una forma de hierro inorgánica que es liberada principalmente de los alimentos tales como verduras o cereales, o como hierro hemo que proviene de la degradación de la hemoglobina y mioglobina contenidas en la carne roja (Shayeghi et al., 2005).

La absorción del hierro hemo es más eficiente que la del hierro no hemo (Pérez et al. 2005). Sin embargo, los mecanismos que participan en la movilización celular del hierro hemo han sido parcialmente aclarados. Se sabe que el grupo hemo se libera de la mioglobina y de la hemoglobina por acción de las enzimas pancreáticas en el lumen duodenal. La absorción de este grupo a través de la membrana apical de los enterocitos es

mediada por un transportador duodenal denominado proteína transportadora de hemo 1 (HCP1, *heme carrier protein 1*) (Shayeghi et al., 2005). Luego, el grupo hemo se degrada en el interior celular por la acción de la hemoxigenasa (HO) liberando el hierro libre que posteriormente forma parte del *pool* de hierro celular junto con el hierro absorbido en la forma no hémica (Raffin et al., 1974). Respecto de la exportación del grupo hemo, se ha identificado un exportador llamado receptor del subgrupo C del virus de la leucemia felina (FLVCR, *feline leukemia virus subgroup C receptor*) que es abundantemente expresado en el duodeno, pero su localización celular no ha sido examinada en detalle (Keel et al., 2008). 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 une al hemo, como la albúmina o la hemopexina (Khan & Quigley, 2011). Por otro lado, el miembro 2 de la subfamilia G de los transportadores ATP vinculantes cassette (ABCG2, *ATP-binding cassette sub-family G member 2*) expresado en el intestino, ha sido sugerido como un posible exportador del grupo hemo, aunque su función en el metabolismo del hierro hémico no ha sido esclarecida (Khan & Quigley, 2011) (Figura 2).

La absorción del hierro no hemo, hierro libre, ha sido ampliamente estudiada, por lo que es más comprendida que la del grupo hemo. La mayor parte del hierro libre de la dieta se halla en su forma férrica, insoluble a pH mayor que 3, de modo que su absorción es compleja. Para favorecer su captación duodenal, se forman complejos de hierro solubles en el estómago que aumentan su biodisponibilidad para ser absorbidos con mayor facilidad (Pérez et al., 2005).

El proceso de absorción del hierro libre en el duodeno requiere que el hierro férrico de la dieta sea previamente reducido a hierro ferroso. Este proceso es llevado a cabo por una ferri-reductasa localizada en la membrana apical de los enterocitos, que se denomina citocromo duodenal B (DcytB) (McKie, 2001). El ácido ascórbico participa en esta vía de reducción de hierro como suministro de agentes reductores para DcytB (Lane et al., 2015). La función de DcytB en el ciclo del hierro fue identificada por estudios que demostraron que su regulación es dependiente de las necesidades sistémicas de hierro (McKie, 2001; McKie, 2008). Sin embargo, mediante el empleo de ratones *knock-out* para esta ferri-reductasa se demostró que esta enzima no es imprescindible para la absorción duodenal de hierro, por lo que otras proteínas con actividad reductasa presentes en la mucosa intestinal podrían desarrollar esta función (Gunshin et al., 2005) (Figura 2).

Luego del proceso de reducción, el hierro ferroso es importado al interior de los enterocitos a través del transportador de metales divalentes 1 (DMT1, *divalent metal transporter 1*), previamente conocido como transportador de cationes divalentes 1 (DCT1, *divalent cation transporter 1*) o proteína 2 de resistencia natural asociada a macrófagos (Nramp2). El importador DMT1 es una proteína altamente hidrofóbica con 12 segmentos transmembrana, que posee la capacidad no solo de transportar hierro, sino también, diversos cationes divalentes como manganeso, cobalto, zinc, cadmio y plomo (Andrews, 1999; Garrick et al., 2003). Su función fisiológica es relevante en el duodeno, debido a que se encarga de movilizar el hierro a través de la membrana apical de enterocitos hacia el citoplasma, proceso que se ve favorecido por el gradiente de protones. Esto indica que su actividad es dependiente del pH del medio, siendo óptima a pH ácidos (Gunshin et al., 1997). Dos isoformas de DMT1 se generan por corte alternativo en el extremo 3' del ARNm primario de DMT1: la isoforma I, caracterizada por la presencia de un elemento de respuesta al hierro (IRE, *iron responsive element*), y la isoforma II que no posee dicho elemento (Andrews, 1999). En estudios más recientes, se ha demostrado que también existe un *splicing* en el extremo 5' del ARNm primario de DMT1, por lo que en total se producen 4 transcriptos posibles del importador: 1A-IRE; 1A-no IRE; 1B-IRE y 1B-no IRE (Mackenzie et al., 2007).

Otro transportador de metales que ha sido relacionado con el ciclo del hierro es el producto proteico del gen Slc39a14, el importador ZIP14 (*Zrt Irt-like Protein 14*) (Taylor et al., 2005; Liuzzi et al., 2006). Se ha demostrado que este transportador es capaz de mediar la captación de diversos metales divalentes de importancia nutricional, como el hierro (Jenkitkasemwong et al., 2012). En este sentido, Liuzzi et al. (2006) demostraron que la transfección de células HEK 293T con cDNA de ZIP14 aumentó la acumulación celular de hierro, evidenciando que ZIP14 podría funcionar como una proteína de importación del hierro libre. Se sabe que este transportador se encuentra altamente expresando en el duodeno, pero su función en la absorción del hierro de la dieta no es claramente comprendida (Liuzzi et al. 2006).

Por otro lado, el hierro en estado férrico también puede ser captado por los enterocitos mediante la proteína β 3-integrina, siendo luego transferido a la proteína chaperona mobilferrina (Conrad et al., 1993). Debido a 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. Además, se conoce que DMT1 también forma parte de este complejo de proteínas, en el cual su función sería transportar el hierro ferroso al citoplasma (Umbreit et al., 2002) (Figura 2).

Una vez que el hierro se encuentra en el interior del enterocito en estado ferroso, puede ser oxidado nuevamente a estado férrico para su almacenamiento en la ferritina, proteína que puede depositar hasta 4500 átomos de hierro en cada molécula (Torti & Torti, 2002). Esta habilidad de almacenar hierro le confiere a la ferritina una doble función, como proteína detoxificadora y de reserva. Su peso molecular es de 430-460 KDa y presenta una cadena liviana (L, *light*) y una cadena pesada (H, *heavy*). Se ha descrito que la cadena H incorpora hierro a una tasa mucho mayor que la cadena L, lo que podría deberse a la presencia de una ferroxidasa central asociada a la cadena H que produciría la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} (Ponka, 1999). Por ello, la ferritina rica en subunidades L capta hierro más lentamente, pero su acumulación es a más largo plazo. Los tejidos que almacenan hierro como el hígado y el bazo, presentan ferritina ricas en la subunidad L con un alto contenido de hierro (Torti & Torti, 2002) (Figura 2).

El hierro ferroso que no forma parte de los depósitos en la proteína ferritina, puede ser exportado hacia la sangre a través del exportador de hierro ferroportina (FPN) (McKie et al., 2000; Wessling-Resnick, 2006). Este mecanismo de exportación requiere de la actividad oxidasa de la proteína de membrana hefastina, enzima ferro-oxidasa que posee la capacidad de convertir el Fe^{2+} a Fe^{3+} (Han & Kim, 2007). La expresión de FPN es regulada por los cambios en los niveles celulares de hierro, dado que este exportador contiene en su ARNm un elemento de respuesta al hierro (IRE) localizado en el extremo 5' (Lymboussaki et al., 2003). Un estudio reciente identificó la presencia de una isoforma del exportador denominada FPN B que carece del elemento IRE, por lo que no es regulada por hierro, y que se expresa en enterocitos duodenales y en precursores eritroides (Zhang et al., 2009).

Luego de la exportación y oxidación, el hierro férrico forma un complejo con la principal proteína de transporte de hierro en plasma, la transferrina (Tf, *transferrin*), debido a que este biometal no puede circular en forma libre por su elevada capacidad para generar radicales libres (Emerilt et al., 2001; Wang & Pantopoulos, 2011).

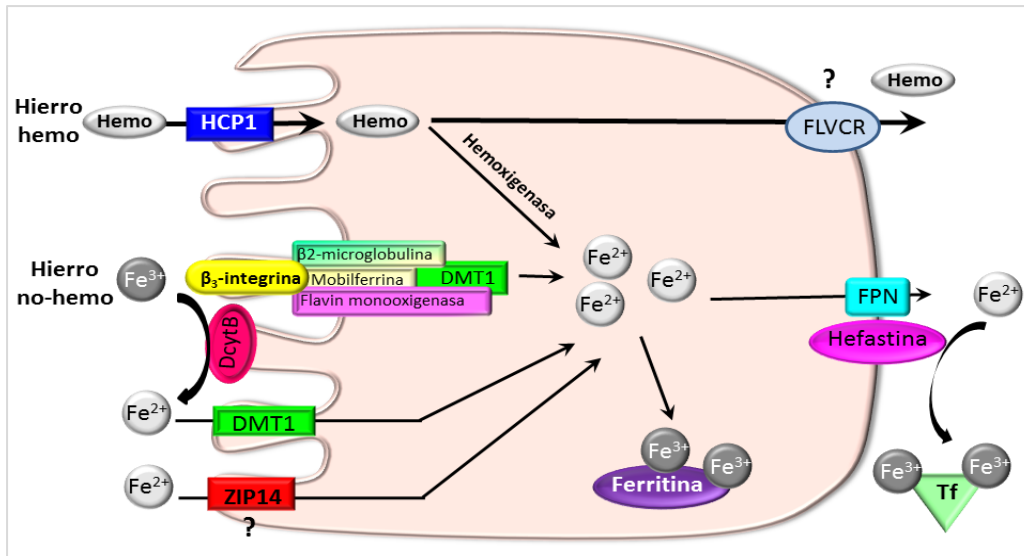


Figura 2. Mecanismos de absorción duodenal de hierro.

3. DISTRIBUCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE HIERRO

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

Es sabido que sólo el 30% de la transferrina se halla saturada con hierro en estados de balance normal, por lo que el 70 % restante actúa como mecanismo protector capaz de captar el exceso de hierro, evitando la toxicidad que el hierro libre podría generar. Sin embargo, en estados de sobrecarga de hierro la capacidad de saturación de la Tf puede ser superada, situación en la que este biometal puede unirse a ligandos como el citrato, constituyendo el *pool* de hierro no unido a Tf (NTBI, *non transferrin bound iron*) (Pérez et al., 2005).

En circulación, la Tf distribuye el hierro por el organismo hasta los tejidos de absorción, almacenamiento y utilización (Ponka, 1999). Las células adquieren el hierro unido a la Tf mediante el receptor de transferrina 1 (RTf1, *transferrin receptor 1*), glicoproteína homodimérica que pesa aproximadamente 190 KDa, en el cual los monómeros se encuentran ligados entre sí por dos puentes disulfuro. Cada molécula del RTf1 tiene la capacidad para unir dos moléculas de Tf (Ponka, 1999).

Al igual que DMT1, el ARNm del RTf1 posee el segmento IRE en el extremo 3', por lo que los niveles proteicos de este receptor son regulados por la concentración celular de hierro (Andrews, 1999). El RTf1 también posee elementos de respuesta a la hipoxia (HRE, hypoxia responsive element) presentes en su ARNm (Pérez et al., 2005; Graham et al., 2007). Además, existen evidencias sobre la interacción del RTf1 con la proteína asociada a la hemocromatosis (HFE), donde HFE compite con la Tf por el sitio de unión al RTf1 (Pantapoulos, 2008).

El complejo RTf1-Tf-Fe³⁺ es endocitado mediante la formación de vesículas revestidas de clatrina (Muñoz et al., 2009). Luego, la cubierta de clatrina es retirada y los endosomas se acidifican a través de la incorporación de protones mediante un mecanismo dependiente de ATP, lo que produce cambios conformacionales en la Tf y en el RTf1 que promueven la liberación del Fe³⁺ de la Tf, quedando la apotransferrina. El Fe³⁺ libre se reduce a Fe²⁺ por una ferrireductasa y se transporta hacia el citoplasma a través de DMT1, mientras que el RTf1 retorna a la membrana plasmática y la apotransferrina es liberada nuevamente a la circulación (Andrews, 2008). Se ha descrito que el producto proteico del gen STEAP3 sería la ferri-reductasa endosomal encargada de reducir el Fe³⁺ a Fe²⁺ (Graham et al., 2007) (Figura 3).

Recientemente se ha demostrado que el transportador de hierro ZIP14 participa no solo de la captación de NTBI, sino que también está involucrado en la vía RTf1-Tf transportando el Fe²⁺ desde el endosoma hacia el citoplasma celular, de manera similar a DMT1 (Zhao et al., 2010). Estos autores demostraron que la transfección de células HEK 293T con ZIP14 aumentó la captación de TBI, y la supresión de ZIP14 redujo su absorción. Además, también caracterizaron su distribución subcelular, identificando su ubicación en la membrana endosomal.

Una vez que el Fe²⁺ se encuentra en el citoplasma celular puede formar parte de los depósitos de hierro a través de su unión a la proteína de depósito ferritina. También, el hierro puede ser almacenado en forma de hemosiderina, pigmento que se produce luego de la degradación de la cubierta proteica de la ferritina (Iancu, 2011). A diferencia de la ferritina, la hemosiderina es un compuesto de almacenamiento de hierro heterogéneo de difícil caracterización bioquímica y ultraestructural (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).

El Fe^{2+} que no se deposita en forma de ferritina o de hemosiderina, puede ser exportado desde el interior celular a través de FPN (McKie et al., 2000). La función de FPN como proteína exportadora, depende de la actividad de una oxidasa presente en hepatocitos y células fagocíticas denominada ceruloplasmina (Cp, *ceruloplasmin*) (Knutson & Wessling-Resnick, 2003). Cp es una ferroxidasa multi-cobre que facilita el proceso de exportación de hierro en hígado y en macrófagos a través de la conversión del hierro ferroso a férrico (Vashchenko & MacGillivray, 2013). Nuevamente, el Fe^{3+} es incorporado a la Tf en circulación permitiendo su distribución en el organismo (Graham et al., 2007) (Figura 3).

Existe otro receptor de Tf, el RTf2, cuya participación en la captación de hierro es menos conocida que la del RTf1 (Kawabata et al., 1999). El gen del RTf2 codifica para una proteína de membrana que posee 45% de identidad con el RTf1 en su dominio extracelular. Al igual que el RTf1, la interacción entre el RTf2 y la Tf es dependiente del pH: 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). Sin embargo, una importante diferencia entre ambos receptores es la afinidad por la holotransferrina, dado que la del RTf2 es aproximadamente 25 veces menor que la del RTf1 (Kawabata et al., 2000; Pérez et al., 2005). Otra diferencia es que la secuencia consenso de internalización del RTf2 no es idéntica a la del RTf1, lo que sugiere la presencia de distintos mecanismos de endocitosis y, posiblemente, un procesamiento intracelular diferente. Además, el ARNm del RTf2 no posee secuencias IRE, lo que explica la falta de su regulación por los niveles celulares de hierro (Kawabata et al., 1999). Se ha propuesto que los niveles proteicos de este receptor serían regulados post-traduccionalmente por la Tf-diférrica, donde la unión del ligando estabilizaría al receptor. Por otro lado, una característica común de ambos receptores, es que el RTf2 también interacciona con la proteína de la hemocromatosis (HFE) (Graham et al., 2007).

Además de la captación de TBI, en el hígado también se produce la captación del hierro no unido a Tf (NTBI), para almacenar el exceso de hierro y evitar la toxicidad que este biometal podría causar cuando se encuentra libre. En este contexto, se ha descrito que DMT1 y ZIP14 participarían en la captación de esta forma de hierro (Graham et al., 2007). Estudios inmunohistoquímicos de ZIP14 lo han localizado en la membrana plasmática de hepatocitos (Liuzzi et al., 2006). Sin embargo, la regulación hepática de ZIP14 no ha sido

totalmente dilucidada, dado que algunos autores han demostrado que los niveles de este transportador en hígado no son regulados por hierro, mientras que otros recientemente demostraron un aumento de ZIP14 hepático en exceso de hierro (Hansen et al., 2010; Nam & Knutson, 2012; Nam et al., 2013). No obstante, actualmente se ha sugerido que ZIP14 sería un transportador clave en la captación hepática de NTBI, una forma de hierro que aparece en estados de sobrecarga de hierro (Jenkitkasemwong et al., 2015) (Figura 3).

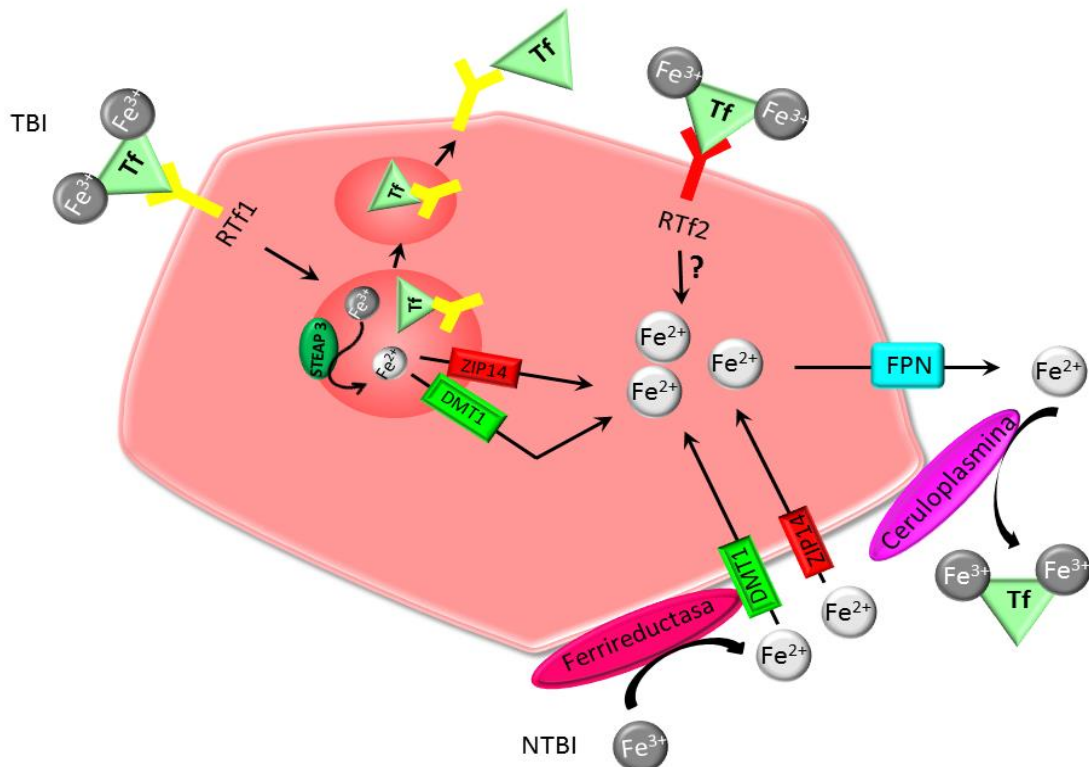


Figura 3. Mecanismos de movilización del hierro en hepatocitos.

4. REUTILIZACIÓN DE HIERRO

Como fue mencionado anteriormente, el reciclado de hierro de los eritrocitos senescentes o alterados, es un proceso que forma parte de la homeostasis del hierro. En condiciones fisiológicas, aproximadamente 25 mg de hierro por día son utilizados por los eritrocitos inmaduros en la médula ósea para la síntesis del grupo hemo (Knutson & Wessling-Resnick, 2003). Las células que se encargan de este proceso son los macrófagos del sistema retículoendotelial (SER) del bazo, hígado y médula ósea, células cuya principal vía de captación de hierro es la eritrofagocitosis (Knutson & Wessling-Resnick, 2003). Luego de la fagocitosis de los eritrocitos, las enzimas hidrolíticas presentes en los fagolisosomas se encargan de degradar los glóbulos rojos. Posteriormente, el hierro del grupo hemo de la hemoglobina es liberado por la digestión enzimática mediada por HO-1 y, en menor medida,

por HO-2 (Khan & Quigley, 2011). Ambas hemoxigenasas, HO-1 y HO-2, catabolizan al grupo hemo produciendo biliverdina, monóxido de carbono y Fe^{2+} . El Fe^{2+} libre puede ser incorporado en la ferritina o exportado de la célula a través de FPN-Cp (Knutson & Wessling-Resnick, 2003).

En los macrófagos, también existen otros mecanismos de importación de hierro, como la captación del hierro unido a la Tf a través del RTf1 (Knutson & Wessling-Resnick, 2003). Otra vía de importación de hierro es mediada por el receptor CD163, expresado exclusivamente en monocitos y en macrófagos, que capta el complejo formado entre la haptoglobina y la hemoglobina liberada por la destrucción de eritrocitos en el espacio intravascular (Kristiansen et al., 2001).

En el interior de los macrófagos, la proteína natural de resistencia asociada a macrófagos 1 (Nramp1) y DMT1 participan en el reciclado de hierro luego de la eritrofagocitosis transportando el hierro desde el interior de las vesículas fagocíticas hacia el citoplasma celular (Soe-Lin et al., 2009; Tabuchi et al., 2010). Además, se ha sugerido que el hierro hemo podría ser exportado desde las vesículas a través de transportadores del grupo hemo como HCP1, pero los mecanismos no han sido esclarecidos (Khan & Quigley, 2011).

Por último, como fue descripto para las células que utilizan el hierro, la única vía de exportación de hierro conocida hasta el presente en macrófagos es mediante FPN (Knutson et al., 2005). Luego, la ceruloplasmina plasmática promueve la oxidación del hierro facilitando de esta manera su incorporación a la apotransferrina circulante (Kaplan, 2002).

5. REGULACIÓN DEL METABOLISMO DEL HIERRO

5.1. Regulación mediada por HEPCIDINA

5.1.1. Generalidades

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). Sin embargo, la relevancia

fisiológica de la producción de hepcidina en estos tejidos extra-hepáticos no ha sido esclarecida, pero podría participar en la regulación local de la movilización de hierro.

En humanos se identificó un solo gen para hepcidina, mientras que en el genoma de ratón se caracterizaron 2 genes que codifican para este péptido, denominados HEPC1 y HEPC2, siendo HEPC1 el gen que participa en el metabolismo del hierro (Lou et al., 2004).

La primera función descrita para hepcidina fue su actividad antimicrobiana, que involucra propiedades microbicidas contra diversos microorganismos evaluadas mediante estudios *in vitro* (Krause et al., 2000; Michels et al., 2015). Se sabe que la hepcidina restringe la disponibilidad extracelular de hierro. Por lo tanto, este péptido controlaría algunas infecciones bacterianas extracelulares en forma de "inmunidad nutricional" (Michels et al., 2015). Sin embargo, la función de este péptido en la mayoría de las infecciones aún no ha sido definida. Si bien la síntesis de hepcidina es estimulada en respuesta a varios patógenos virales y fúngicos, su contribución a las defensas del huésped contra estas infecciones es desconocida (Potrykus et al., 2013; Leal et al., 2013; Michels et al., 2015).

La asociación entre hepcidina y el ciclo del hierro fue identificada por Pigeon et al. (2001), quienes demostraron que los niveles del ARNm de hepcidina son regulados en la sobrecarga de hierro inducida. Un estudio posterior, llevado a cabo en una cepa de ratones *Usp2* (*Upstream stimulatory factor 2*) que carecen de hepcidina, identificó el desarrollo de la sobrecarga de hierro hepática en estos ratones (Nicolas et al., 2001). En línea con estos hallazgos, se determinó una rápida disminución de los niveles séricos de hierro luego de la inyección del péptido hepcidina en ratones (Rivera et al., 2005).

Las evidencias experimentales sugieren que la función de hepcidina en el metabolismo del hierro es atenuar la absorción intestinal de hierro y la liberación del biometal desde los macrófagos del sistema retículoendotelial (SRE), disminuyendo su biodisponibilidad (Ganz & Nemeth, 2006).

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 (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 (Pigeon et al.,

2001; Valore & Ganz, 2008). Se sabe 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).

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 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.

Los avances respecto a la determinación cuantitativa de hepcidina involucran inmunoensayos enzimáticos para la detección de prohepcidina sérica humana. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que los niveles séricos de pro-hepcidina no se correlacionan con los de hepcidina ni con los parámetros relacionados con el hierro en pacientes con diversas patologías que afectan los niveles de hepcidina, como hemocromatosis hereditaria, insuficiencia renal crónica, inflamación y anemia, posiblemente debido a una baja estabilidad del pro-péptido en circulación (Kulaksiz et al., 2004; Roe et al., 2007; Sasu et al., 2010). Estos estudios evidencian que no existiría una correlación entre los niveles de prohepcidina y de hepcidina en suero.

En células de hepatoma humano HepG2 y en cultivo primario de hepatocitos, Valore & Ganz (2008) 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 literatura solo se describe que la síntesis de hepcidina hepática es regulada transcripcionalmente por el hierro, la actividad eritropoyética y la inflamación; sin existir datos que revelen otro tipo de regulación (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.

En el año 2008 se desarrolló un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que permite la detección de hepcidina sérica en humanos (Ganz, 2008). Sin embargo, recién en el año 2015 se describió un ELISA que permite la detección de hepcidina sérica en ratones, siendo esta publicación posterior a nuestros estudios (Gutschow et al., 2015). Es importante

aclarar que esta técnica no ha sido estandarizada para cuantificar los niveles de hepcidina en homogenados tisulares que nos permita evaluar su expresión en tejidos extrahepáticos.

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 de su pro-péptido, el cual se encuentra bien correlacionado con los niveles tisulares de hepcidina (Valore & Ganz, 2008).

5.1.2. Regulación de hepcidina

La síntesis de hepcidina es regulada por diversos estímulos que incluyen las reservas de hierro tisular, la saturación de transferrina, la hipoxia y la inflamación. Además, la demanda eritropoyética también regula los niveles de hepcidina para aumentar la disponibilidad de hierro requerido para la eritropoyesis (Rishi et al., 2015).

5.1.2.1. Reguladores positivos

Es ampliamente conocido que la vía regulatoria en la que participan proteínas morfogenéticas óseas (BMP, *bone morphogenetic proteins*) y SMADs (*sma and mothers against decapentaplegic homologue*) posee una función central en la regulación de la síntesis de hepcidina en respuesta a los niveles de hierro del organismo (Rishi et al., 2015). La relación entre la vía SMAD y el metabolismo del hierro fue descubierta cuando se observó el desarrollo de sobrecarga de hierro en ratones que presentaban una delección de SMAD4 específica de hígado (Wang et al., 2005).

La vía regulatoria que involucra las proteínas BMPs regula diversos procesos fisiológicos, como la morfogénesis embrionaria, el desarrollo óseo y la reparación de tejidos. En el hígado, esta vía parece haber sido específicamente adaptada para la regulación del hierro (Ganz & Nemeth, 2012). Diversos estudios han descripto que BMP-6 sería el principal

regulador endógeno de hepcidina (Kautz et al., 2008; Meynard et al., 2009; Andriopoulos et al., 2009). Inicialmente, se identificó una relación directa entre los niveles del transcrito de BMP-6 y los niveles de hepcidina hepática en ratones alimentados con una dieta enriquecida en hierro (Kautz et al., 2008). Posteriormente, se demostró que ratones *knock-out* para BMP-6, poseen elevada acumulación de hierro en el hígado y reducida expresión hepática de hepcidina (Meynard et al., 2009; Andriopoulos et al., 2009). Por lo tanto, estos estudios apoyan el concepto de que la proteína BMP-6 es requerida para regular apropiadamente los niveles de hepcidina. Asimismo, otras BMPs, como BMP-2, -4, -5, -7 y -9, también inducen la expresión de hepcidina in vitro, pero sus funciones fisiológicas en la regulación del ciclo del hierro no han sido claramente determinadas (Babitt et al., 2007).

Se ha descrito que tanto BMP-6, como su co-receptor denominado hemojuvelina (HJV), son esenciales para la homeostasis del hierro en ratones, debido a que ratones *knock-out* para BMP-6 o para HJV desarrollan una marcada sobrecarga de hierro (Meynard et al., 2009; Andriopoulos et al., 2009).

Ramsay et al. (2008) demostraron que una serino-proteasa llamada TMPRSS6, también conocida como matriptasa-2, participa en la vía regulatoria HJV-BMP a través del clivaje de HJV. Esta proteasa transmembrana, expresada principalmente en el hígado, actuaría como un inhibidor de la síntesis de hepcidina dado que solo la forma heterodimérica de HJV activa la síntesis de hepcidina in vitro (Pagani et al., 2008). Este hallazgo agrega otra proteína que interviene en la compleja red de proteínas que regulan la síntesis de hepcidina. Además, en un estudio reciente se demostró que la disminución intracelular del hierro aumenta los niveles de la proteína TMPRSS6 en células HepG2, revelando que la regulación de TMPRSS6 por el hierro intracelular podría ser una nueva vía que controla la regulación de hepcidina a través de la escisión de HJV (Zhao et al., 2015).

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 la 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 (De Domenico et al., 2007). En este sentido, recientemente se ha demostrado que las proteínas BMP-6 y HJV regulan la síntesis

de hepcidina cuando los niveles de hierro hepáticos son elevados, debido a que ratones *knock-out* para BMP-6 y HJV no aumentaron apropiadamente los niveles de hepcidina en respuesta al alto hierro hepático (Ramos E. et al., 2011). En este estudio también describió que la regulación de hepcidina por el hierro intracelular sería independiente de la proteína de la hemocromatosis (HFE) y del receptor de transferrina 2 (RTf2), proteínas que han sido identificadas en la regulación de hepcidina mediada por la saturación de transferrina (hierro sistémico) (Pantapoulos, 2008).

La regulación de hepcidina por el estado sistémico del hierro (saturación de transferrina) requiere de moléculas que funcionan como sensores del hierro. La evidencia genética y bioquímica sugiere que los receptores de transferrina, RTf1 y RTf2, junto con HFE de membrana, pueden actuar como un sensor de la holotransferrina (transferrina diférrica) (Rishi et al., 2015). 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). Dicho complejo FeTf-RTf2-HFE estimula la expresión de hepcidina a través de la activación de ciertas vías regulatorias (Figura 4). La señalización mediada por MAPK/ERK ha sido propuesta como una vía reguladora de la síntesis de hepcidina, pero los mecanismos moleculares no han sido claramente dilucidados (Ramey et al., 2009).

Estudios recientes que interconectan al complejo FeTf-HFE-RTf2 con la vía regulatoria dependiente de BMP6-SMAD han demostrado que HFE y RTf2 también modulan la expresión de hepcidina a través de la vía BMP-SMAD (McDonald et al. 2014; Wu et al., 2014). En este sentido, se describió que HFE se une al receptor de BMP tipo I. Esta interacción produce la estabilización del receptor en la superficie celular activando la señalización BMP-SMAD, lo que aumenta la expresión de hepcidina (Wu et al., 2014). Además, en ratones deficientes del RTf2 se ha demostrado la presencia de bajos niveles de SMAD1/5/8 fosforiladas en hígado, sugiriendo que RTf2 también modula la vía SMAD-BMP (Corradini et al., 2011). En línea con este estudio, recientemente fue propuesto que RTf2 está implicado en la estimulación de la síntesis de BMP-6 por hierro (McDonald et al., 2014).

Teniendo en cuenta estos recientes estudios que le adjudican a RTf2 y HFE nuevas funciones en la vía reguladora BMP6-SMAD, Rishi et al. (2015) propusieron un nuevo modelo para la regulación de hepcidina. En esta revisión se propuso 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 (Figura 4).

La relevancia funcional de HFE, HJV, RTf2 y BMP-6 en la regulación de hepcidina por los niveles de hierro sistémicos (saturación de transferrina) fue demostrada recientemente por Ramos E. et al. (2011). Estos autores utilizaron ratones *knock-out* simples para HFE, RTf2, BMP-6 y HJV, a los cuales se les realizó una combinación de flebotomías con una dieta baja en hierro y, luego, fueron alimentados en forma aguda con una dieta rica en hierro. De esta manera aumenta la saturación de transferrina y no cambia el hierro hepático. Estos estudios permitieron concluir que HFE, HJV, RTf2 y BMP-6 regulan el aumento de hepcidina en respuesta a la saturación de Tf, debido a que la expresión de hepcidina no aumentó apropiadamente por la alta saturación de transferrina en los ratones *knock-out* para estas proteínas (Ramos E. et al., 2011).

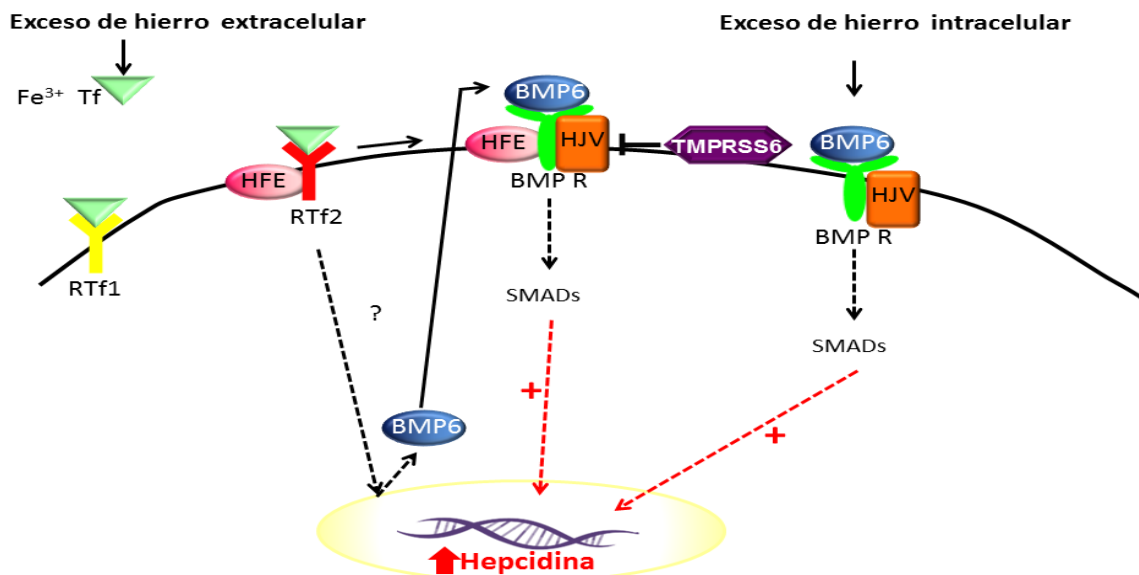


Figura 4. Esquema representativo de la regulación de hepcidina hepática por hierro.

Recientemente, Latour et al. (2015) realizaron un análisis comparativo de diferentes modelos murinos de hemocromatosis, postulando la existencia de dos nuevas vías que controlan la expresión de hepcidina por hierro: una que detecta la concentración de transferrina diférrica (mediada principalmente por BMP-2, HJV, RBMP tipo II, RBMP tipo I, RTf2 y HFE) y otra que censa el hierro intracelular (mediada por BMP-6, RBMP tipo II y RBMP tipo I) (Figura 5).

Respecto de la primera vía regulatoria, Latour et al. (2015) sugirió que la regulación de hepcidina por la saturación de transferrina en ratones *knock-out* para BMP-6 podría involucrar a BMP-2. Esta propuesta se debe a la reciente identificación de la estructura cristalina de HJV en complejo con BMP-2 (Healey et al., 2015). El dominio N-terminal de HJV imita la estructura de los receptores de BMP tipo I, por lo que HJV compite con el receptor de BMP de tipo I por la unión a BMP-2 (Healey et al., 2015). Por lo tanto, se sugirió que las proteínas BMP-2 serían reclutadas a la membrana a través de su interacción con HJV (Latour et al., 2015). Este complejo, HJV-BMP2, podría entonces asociarse con el receptor de BMP tipo II, para luego ser endocitado en compartimentos endosomales. Dado que Healey et al. (2015) describieron que la interacción HJV-BMP es dependiente del pH, Latour et al. (2015) sugirieron que la acidificación del interior de los endosomas produciría la disociación del complejo HJV-BMP2, siendo la HJV reemplazada por los receptores de BMP tipo I. Finalmente, la unión entre RBMP tipo II, BMP-2 y RBMP tipo I activaría la vía de señalización mediada por SMADs (Figura 5).

La función del complejo TfR2-HFE sigue siendo discutida, pero se sabe claramente que ambas proteínas son necesarias para el censado de la transferrina diférrica. Por lo tanto, la interacción de RTf2 y HFE podría ser necesaria para que el complejo HJV-BMP2-RBMP tipo II sea eficientemente endocitado, proporcionando un vínculo entre la transferrina diférrica y la vía de señalización BMP-SMAD (Latour et al., 2015).

El segundo mecanismo regulatorio propuesto por Latour et al. (2015), implicaría la activación de la vía SMAD a través de complejos de receptores de BMP preformados (Nohe et al., 2002). Se sugirió que BMP-6 interacciona con los complejos preformados entre los receptores de BMP de tipo I y tipo II. Esta interacción, daría lugar a la activación del complejo BMP6-RBMP II-RBMP I que estimularía la vía SMAD de acuerdo a los niveles intracelulares de hierro, dado que la síntesis de BMP-6 aumenta cuando el nivel celular de hierro es elevado (Latour et al., 2015). En este sentido, Latour et al. (2015) postularon que

BMP-6 pueden inducir la expresión de hepcidina por una vía independiente de las moléculas HFE, HJV y RTf2 (Figura 5).

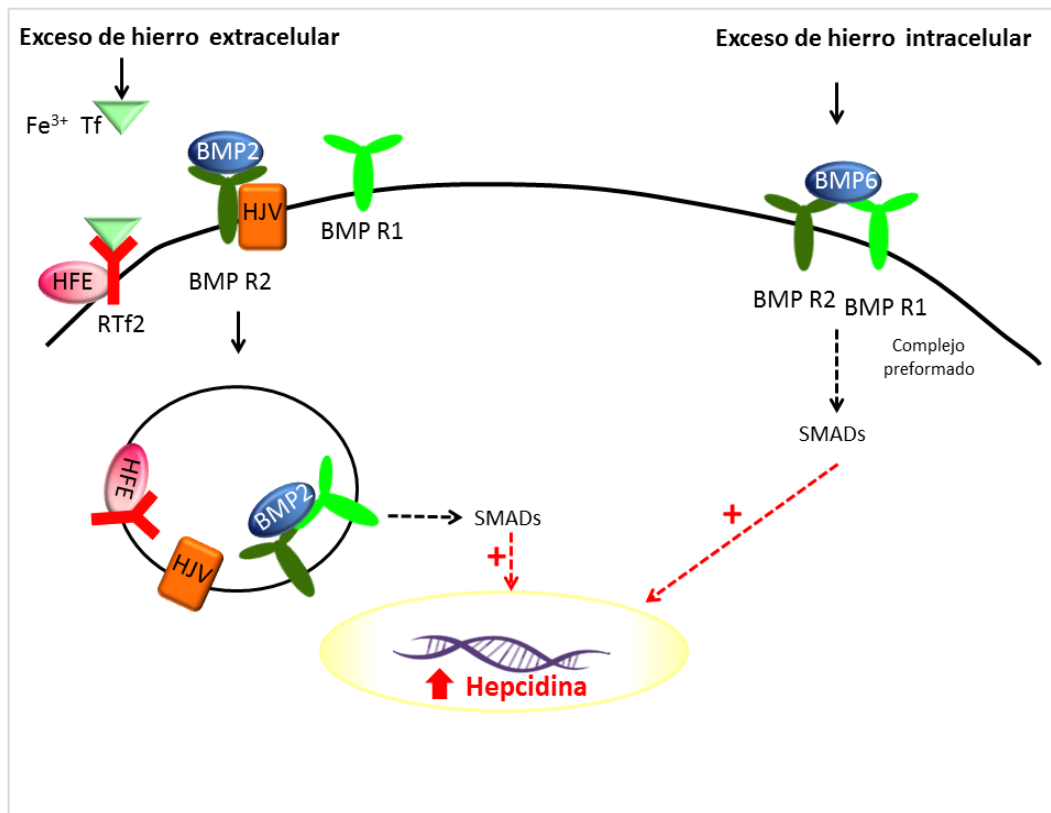


Figura 5. Esquema representativo de las nuevas vías propuestas para la regulación de hepcidina hepática mediada por hierro (Adaptado de Latour et al. 2015).

Por otro lado, en inflamación, la síntesis de hepcidina en los hepatocitos es regulada transcripcionalmente por la interleuquina 6 (IL-6) a través de la vía de señalización de STAT-3 (Ganz & Nemeth, 2012). Esta vía regulatoria, y posiblemente otros mecanismos, aumentan la producción de hepcidina durante infecciones y enfermedades inflamatorias sistémicas, desarrollando hipoferrremia. Aunque la eficacia de este mecanismo en la defensa del huésped contra microbios específicos no ha sido demostrada, el aumento de la susceptibilidad a ciertas infecciones en los pacientes con hemocromatosis hereditaria sugiere que esta respuesta de hepcidina probablemente limitaría la multiplicación dependiente de hierro de los microbios extracelulares (Frank et al., 2011).

5.1.2.2. Reguladores negativos

Los procesos fisiológicos que requieren un suministro constante de hierro, como la eritropoyesis, actúan como reguladores negativos de la síntesis de hepcidina. La represión de HAMP es un mecanismo que aumenta el hierro biodisponible para mantener su homeostasis (Rishi et al., 2015).

Se ha descrito que la inhibición de la hematopoyesis por irradiación y por inducción de policitemia post-transfusional aumentaron dramáticamente los niveles de hepcidina, lo que indica que la eritropoyesis reprime la expresión de hepcidina (Vokurka et al., 2006). Fisiológicamente, esto sería importante en casos de hemorragia o hemólisis, donde hay una pérdida rápida de sangre y posteriormente un marcado aumento de la demanda de hierro para restaurar el eritrón.

Es sabido que una de las principales moléculas de señalización que median la eritropoyesis es la eritropoyetina (EPO); que se produce principalmente en el riñón y se requiere para una adecuada eritropoyesis. En humanos que fueron tratados con EPO, los niveles de hepcidina circulantes disminuyeron bruscamente dentro de las 24 horas y mostraron una supresión máxima a las 72 horas, confirmando la regulación negativa de EPO sobre los niveles de hepcidina (Ashby et al., 2010). Se ha sugerido que esta regulación sería indirecta, dado que en estudios llevados a cabo en ratones se observó que la flebotomía o el tratamiento con EPO no indujeron cambios en los niveles de hepcidina en animales que fueron previamente irradiados o tratados con inhibidores de la eritropoyesis (Pak et al., 2006; Sasaki et al., 2012). En línea con estos estudios, recientemente se describió la falta de inhibición de la síntesis de hepcidina en células de hepatoma expuestas a diversas concentraciones de EPO, que confirmaría que la supresión de hepcidina no requiere la unión directa de EPO a sus receptores hepáticos (Gammella et al., 2015). Estos autores, también sugirieron que la administración de EPO en ratones estimula la síntesis del regulador eritroide ERFE (*erythroid factor erythroferrone*) en eritroblastos, el cual inhibe la síntesis de hepcidina (Figura 6).

Por otro lado, se sabe que las condiciones hipóxicas aumentan la eritropoyesis para aumentar la disponibilidad de oxígeno. De manera similar a la eritropoyesis, se demostró que los niveles de hepcidina disminuyen en hipoxia (Nicolas et al., 2002). Uno de los elementos regulatorios más importantes que actúa en respuesta a la hipoxia es el factor de

transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) (Fandrey, 2004). Esta proteína es un heterodímero compuesto por subunidades α y subunidades constitutivas β (Semenza 2000). En normoxia, la subunidad α del HIF-1 es hidroxilada y posteriormente ubiquitinizada a través de su interacción con la proteína von Hippel-Lindau (pVHL), siendo finalmente degradada en el proteosoma. En hipoxia este proceso es inhibido, y los HIFs en forma de heterodímeros pueden unirse a los elementos de unión de HIF en el ADN actuando como factores de transcripción (Semenza, 2000). La unión de estos factores a elementos de respuesta a hipoxia (HRE, *hypoxia responsive element*), localizados en el gen que codifica para EPO, produce un aumento en los niveles de la proteína (Elbarghati et al., 2008). Por ello, en hipoxia, la producción de EPO y su estimulación eritropoyética podrían contribuir con la regulación negativa de hepcidina observada en esta condición. Además, se ha identificado la presencia de un elemento HRE en el gen que codifica para hepcidina (Peyssonnaud et al., 2007). Este hallazgo sugiere que el factor inducible por hipoxia HIF-1 podría unirse y bloquear la transcripción de hepcidina en condiciones de baja presión parcial de oxígeno como en la hipoxia tisular (Peyssonnaud et al., 2007) (Figura 6).

Además de estos mecanismos regulatorios, recientemente se demostró que la hipoxia media la regulación de hepcidina a través de la estimulación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que controla negativamente a HAMP (Sonnweber et al., 2014). En este estudio también se demostró que esta regulación no sería mediada a través de la vía BMP-SMAD, sino que PDGF-BB disminuye los niveles de hepcidina a través del factor de transcripción CREB-H (*cAMP-responsive element binding protein, hepatocyte specific*). Esta regulación fue propuesta dado que la inyección de PDGF-BB no disminuyó los niveles del ARNm de hepcidina en el hígado de ratones *knock-out* para CREB-H (Sonnweber et al., 2014) (Figura 6).

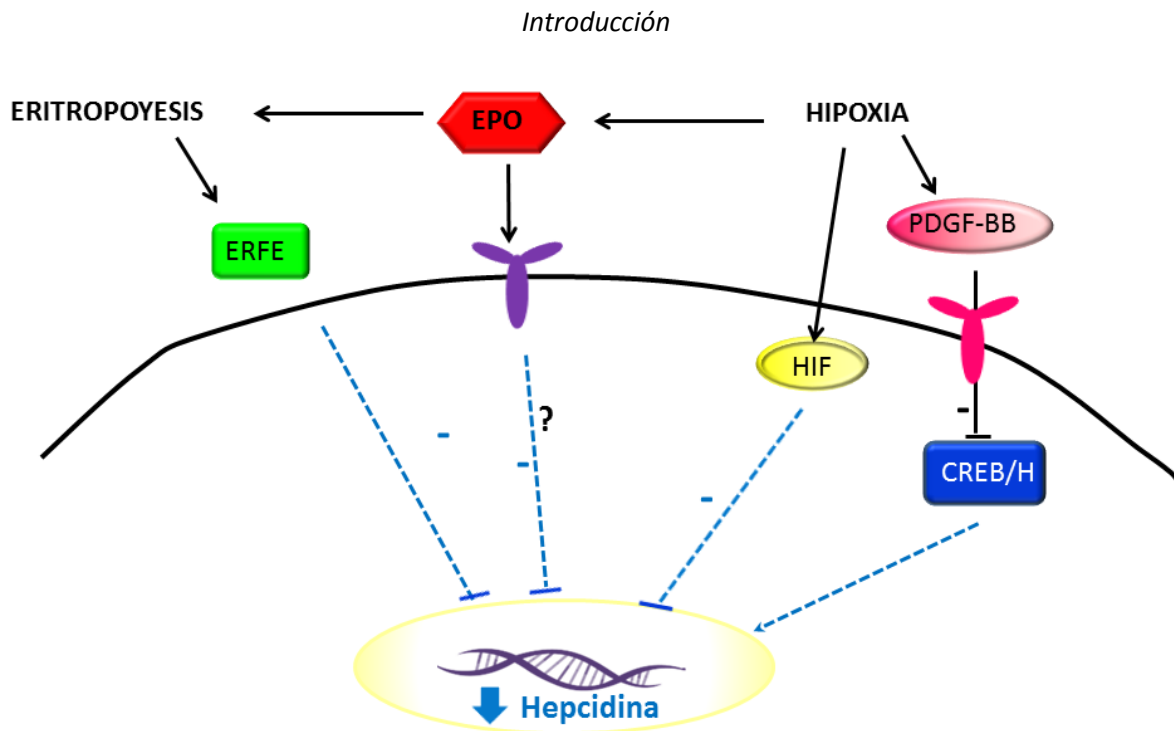


Figura 6. Esquema representativo de la regulación de hepcidina hepática por hipoxia y eritropoyesis. (Adaptado de Rishi et al. 2015)

5.1.3. Ejes regulatorios “hepcidina-FPN” y “hepcidina-DMT1”

Es ampliamente conocido que la hepcidina actúa sobre FPN mediante la unión del péptido a la región extracelular de FPN, lo que conduce a la internalización y degradación del exportador (Nemeth, 2004). Se ha descrito que el residuo cisteína 326 es esencial para la unión de hepcidina a su receptor FPN (Ganz & Nemeth, 2012). De esta manera, la hepcidina regula la exportación celular de hierro a causa de la pérdida de FPN en la membrana plasmática, dado que se requiere que FPN esté localizada en la membrana celular para transportar el hierro hacia la circulación sistémica.

Recientemente, ha sido caracterizada la función regulatoria de hepcidina sobre la captación duodenal de hierro (Mena et al., 2008; Chung et al., 2009; Brasselagnel et al., 2011). Mena et al. (2008) demostraron que la hepcidina disminuye la expresión de DMT1 en células intestinales a través de una regulación transcripcional. Sin embargo, otros autores describieron que el péptido regulador controla los niveles de DMT1 mediante su internalización y degradación, similar a lo descrito para FPN (Brasselagnel et al., 2011). Por lo tanto, los mecanismos moleculares por los cuales hepcidina regula a DMT1 no son claramente dilucidados.

Por lo tanto, cuando los niveles de hepcidina son elevados, como en sobrecarga de hierro, este péptido podría regular a DMT1 en enterocitos para disminuir la absorción de hierro de la dieta y a FPN en células del SRE para reducir la exportación del hierro, ambos procesos favorecen la disminución del hierro biodisponible. Queda claro entonces que el péptido hepcidina cumple una función esencial en la absorción y distribución del hierro en el organismo, por lo que su regulación en estados fisiológicos y fisiopatológicos es crítica y favorece el mantenimiento del equilibrio para que el hierro no se encuentre en déficit ni en exceso.

5.2. Regulación mediada por las PROTEÍNAS REGULADORAS DEL HIERRO

5.2.1. Generalidades

El principal mecanismo regulatorio que controla la movilización de hierro según el nivel celular de este biometal, es el sistema de regulación IRE-IRP (elemento de respuesta al hierro-proteína reguladora del hierro) (Muckenthaler et al., 2008).

Se ha descrito la existencia de dos proteínas IRP denominadas IRP1 e IRP2. IRP1 es una proteína bifuncional que actúa como una enzima aconitasa citosólica (c-acon), catalizando la conversión de citrato a isocitrato cuando el *cluster* de hierro (Fe) y azufre (S) [4Fe-4S] se encuentra unido a la proteína. Sin embargo, cuando pierde dicho *cluster*, IRP1 presenta una elevada afinidad de unión a regiones no traducidas del ARNm denominados IREs, regulando la traducción de proteínas del ciclo del hierro (Anderson et al., 2012).

Un estudio estructural de IRP1 demostró que esta proteína se une a IRE mediante una hendidura presente entre los dominios 1-3 y dominio 4, en la cual se localiza *cluster* [4Fe-4S] de la c-acon (Basilion et al., 1994; Wallander et al., 2006). Cuando dicho *cluster* no está presente en IRP1, la hendidura queda libre permitiendo el reconocimiento de elementos IREs en el ARN mensajero (ARNm) (Wallander et al., 2006). A diferencia de IRP1, IRP2 no contiene el *cluster* [4Fe-4S] y su actividad de unión al segmento IRE se regula mediante su degradación proteosomal (Muckenthaler et al., 2008).

Para que las proteínas IRPs se unan al ARNm se requiere de una estructura en forma de tallo y bucle en el IRE. El bucle contiene seis residuos que generalmente poseen la secuencia

CAGUGX, en donde el sexto nucleótido habitualmente es Uracilo o Citosina (Theil & Eisenstein, 2000). El tallo se divide en dos regiones, superior e inferior, que se componen de pares de bases de secuencias variables separadas por un nucleótido Citosina desapareado (Theil & Eisenstein, 2000; Wallander et al., 2006). Tanto la secuencia del bucle como la presencia de nucleótidos desapareados en los segmentos IRE, son críticos para la unión de IRP.

5.2.2. Regulación de IRPs

Las secuencias de aminoácidos de IRP1 e IRP2 poseen un 64% de identidad. Sin embargo, la regulación de la actividad de unión al ARNm de ambas IRPs es controlada por mecanismos diferentes. IRP1 es una proteína que exhibe una función dual dependiendo del estado celular del hierro. Cuando el nivel celular de hierro está disminuido, el *cluster* [4Fe-4S] se desensambla de IRP1, por lo que aumenta su actividad de unión a segmentos IRE del ARNm de proteínas del hierro, regulando su traducción (Anderson & Vulpe, 2009). Por el contrario, cuando los niveles de hierro son elevados, el *cluster* [4Fe-4S] se ensambla en IRP1 resultando en la pérdida de la afinidad de unión a IRE y adquiriendo función de aconitasa (Anderson & Vulpe, 2009). A diferencia de IRP1, IRP2 se regula principalmente a través de su degradación proteosomal mediada por hierro (Guo et al., 1995). Además, el *cluster* [4Fe-4S] no se ensambla en IRP2 y, por lo tanto, esta isoforma no presenta actividad aconitasa (Wallander et al., 2006)

Por otro lado, IRP1 también es regulada por las especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y por las especies reactivas de nitrógeno (RNS, *reactive nitrogen species*). Ha sido demostrado que ROS puede regular la actividad de IRP1, aunque se observan respuestas variables que dependen de la cantidad y del tipo de ROS examinado (Mueller, 2005; Wallander et al., 2006). Se ha descrito que la actividad de unión de IRP1 al ARNm aumenta por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Pantopoulos & Hentze, 1995b). Sin embargo, IRP1 también puede ser inactivada por elevados niveles de ROS, presumiblemente a través del daño oxidativo y/o degradación (Cairo et al., 1996). Esta pérdida de la actividad de IRP1 en respuesta a la alta concentración de ROS puede representar un mecanismo para limitar el exceso de hierro, dado que una elevada actividad de IRP1 produciría un exacerbado estado de estrés oxidativo (Wallander et al., 2006).

Se ha sugerido que la modulación de la función del IRP1 por RNS tiene una función fisiológica relevante en la respuesta inflamatoria y en la inmunidad mediada por células (Wallander et al., 2006). Numerosos estudios que emplearon cultivos celulares y la proteína IRP1 purificada han establecido que el óxido nítrico (NO) y peroxinitrito (ONOO⁻) aumentan la actividad de unión de IRP1 al ARNm (Drapier et al., 1993; Pantopoulos & Hentze, 1995a; Kennedy et al., 1997).

5.2.3. Eje regulatorio IRP/IRE-proteínas del ciclo del hierro

La unión de IRP a los elementos IRE del ARNm controla la traducción de proteínas que captan, exportan y almacenan hierro, induciendo cambios en la movilización celular de este biometal. Los elementos IREs son regiones no traducidas que se localizan en los extremos 5' o 3' de los ARNm que codifican proteínas implicadas en la captación de hierro (RTf1, DMT1), el secuestro (ferritina, subunidad H y L) y la exportación (FPN) (Anderson et al., 2012).

Cuando la concentración celular de hierro es baja, IRP se unen con alta afinidad al segmento IRE ubicado en el extremo 5' del ARNm de ferritina y de FPN, bloqueando la traducción proteica. Sin embargo, cuando los elementos IREs se localizan en el extremo 3' del ARNm como en el caso de RTf1 y de DMT1, el transcripto es estabilizado a través del bloqueo de su degradación por ARNasa. Por el contrario, cuando la concentración celular de hierro es elevada IRP está inactiva por lo que no se une a IRE, aumentando la traducción de ferritina y de FPN (McKie et al., 2000; Torti & Torti, 2002; Wang & Pantopoulos, 2011). Al mismo tiempo, la falta de interacción IRE-IRP promueve la degradación del ARNm de RTf1 y de DMT1, lo que disminuye su traducción (Casey et al., 1988; Andrews, 1999) (Figura 7).

Esta regulación coordinada de las proteínas que movilizan y almacenan hierro mediada por IRPs asegura que las células adquieran niveles adecuados de hierro según sus necesidades, sin alcanzar niveles tóxicos.

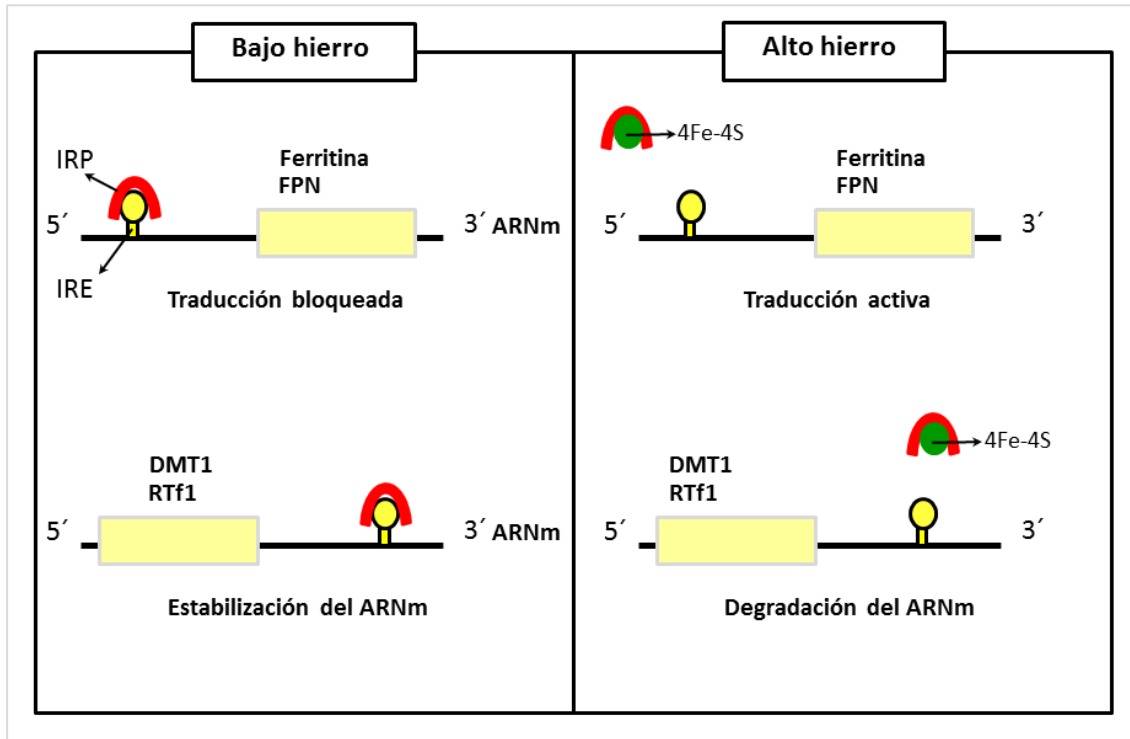


Figura 7. Mecanismo de regulación traduccional mediado por el sistema IRE/IRP.
 (Adaptado de Wallander et al. 2006)

5.3. Regulación mediada por NORMOXIA e HIPOXIA

El promotor del gen que codifica para las proteínas RTf1 y DMT1 contiene elementos de respuesta a HIF, por lo que estas proteínas son reguladas por los niveles tisulares de oxígeno (Lee et al., 1998; Lok & Ponka, 1999). Además, un estudio reciente demostró que HIF-2 posee una función crítica en la regulación de la transcripción de FPN B, isoforma de FPN que no posee segmentos IRE en su ARNm (Taylor et al., 2011).

El factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) es uno de los elementos regulatorios más importantes que actúan en respuesta a la hipoxia. Esta proteína es un heterodímero compuesto por subunidades α y subunidades constitutivas β (Semenza, 2000). Cuando los niveles de oxígeno son normales, la subunidad α del HIF es hidroxilada y posteriormente ubiquitinizada, siendo luego degradada en el proteosoma. Sin embargo, en hipoxia este proceso es inhibido, y los HIFs en forma de heterodímeros pueden unirse a los elementos de unión de HIF en el ADN actuando como factores de transcripción (Semenza, 2000). Además, la actividad de la enzima prolil-hidroxilasa depende del hierro, observándose que los niveles de HIF aumentan en las células con deficiencia de hierro (Metzen & Ratcliffe, 2004). Por ello,

FPN, DMT1 y RTf1 pueden ser controladas por los niveles de hierro y de oxígeno a través de una regulación mediada por HIF.

5.4. Regulación mediada por INFLAMACIÓN

Se describió ampliamente que las proteínas del ciclo del hierro son reguladas por estímulos inflamatorios. En efecto, los elevados niveles de hepcidina inducidos por la inflamación controlan la movilización sistémica de hierro a través de la internalización y degradación del exportador de hierro FPN (Ganz & Nemeth, 2015). Sin embargo, también existen sistemas regulatorios celulares que funcionan de manera independiente de la regulación sistémica. En este sentido, se ha descrito que la inflamación puede afectar la transcripción de FPN (Yang et al., 2002). La inyección de lipopolisacárido (LPS) en ratones o ratas resultó en una disminución de la transcripción de FPN en el bazo y el intestino, siendo esta regulación independiente de citoquinas específicas (Ward & Kaplan, 2012). Además, un estudio reciente demostró que la rápida disminución de FPN inducida por inflamación en los sitios de reciclado del hierro, sería mediado por la estimulación de los receptores *Toll-like 2* y *6*, siendo este mecanismo independiente de hepcidina (Guida et al., 2015).

Se sabe que la activación transcripcional del gen de ferritina, así como también la activación de otros genes de proteínas antioxidantes, es regulada a través de elementos de respuesta antioxidante (ARE, *antioxidant responsive element*) localizados en el ADN (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014). El factor nuclear eritroide-2 (Nrf2, *nuclear factor erythroid 2-related factor*) es requerido para este control transcripcional de ferritina, mediante la unión a los elementos ARE. Cuando los niveles de ROS aumentan, como en la inflamación, el factor Nrf2 se estabiliza y se transloca al núcleo, uniéndose a la secuencia ARE en el promotor del gen de ferritina estimulando su transcripción (Ray et al., 2012).

Respecto de la regulación del importador DMT1 por inflamación, se ha demostrado un aumento de su expresión en diversos tipos celulares como neuronas, astrocitos y células β del páncreas (Hansen et al., 2012; Urrutia et al., 2013). Sin embargo, no han sido totalmente esclarecidos los mecanismos moleculares responsables de esta regulación. Se ha sugerido que DMT1 podría ser regulado por el factor de transcripción NF- κ B, dado que un estudio de Paradkar & Roth (2006) se demostró que este factor de transcripción induce la expresión del transportador en células de carcinoma embrionario P19. En adición, se describió que las

citoquinas TNF- α y LPS inducen la activación del factor de transcripción NF- κ B que se transloca al núcleo regulando la expresión de diversos genes (Hanke & Kielian, 2011; Wajant & Scheurich, 2011). Por lo tanto, las citoquinas pro-inflamatorias podrían aumentar la transcripción de DMT1 a través del factor NF- κ B. Otra posible regulación de DMT1 que ha sido postulada en células neuronales, es la estimulación post-transcripcional del transportador por la activación de IRP1 inducida por el aumento de ROS en inflamación (Wang et al., 2013).

6. ACTUALIZACIÓN DEL CICLO DEL HIERRO

Si bien los estudios del ciclo del hierro se han realizado principalmente en tejidos que participan en la absorción del hierro de la dieta, en su depósito y en su liberación como duodeno, bazo e hígado, los importantes avances en el metabolismo del hierro ampliaron el interés por tejidos que no se han asociado a estos procesos, como el tejido pancreático, renal, pulmonar y nervioso (Ghio, 2009; Núñez et al., 2012; Simcox & McClain, 2013; Martines et al., 2013).

El páncreas endocrino es un órgano particularmente susceptible a alteraciones de la homeostasis del hierro, debido a que expresa bajos niveles de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa que participan en la destrucción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) protegiendo a las células del daño oxidativo (Lenzen et al., 1996; Simcox & McClain, 2013). Por ello, es claro que la adecuada biodisponibilidad de hierro en el páncreas es crucial para evitar la formación de ROS que producen daño celular (Emerilt et al., 2001). Se demostró que la alteración de la funcionalidad endocrina del páncreas implicaría la sobreproducción de ROS tales como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH^\cdot) (Rösen et al., 2001).

La alteración en el estado de estrés oxidativo celular sería el mecanismo responsable del daño de las células β del páncreas productoras de insulina, que se observa en enfermedades que cursan con sobrecarga de hierro (Simcox & McClain, 2013). Si bien se ha identificado la asociación fisiopatológica entre el hierro y el páncreas endocrino, el hierro se acumula primero en la zona exocrina del páncreas en pacientes con siderosis primaria o secundaria, mientras que los depósitos de hierro en las células beta son variables y aparecen en un

estado más avanzado de la enfermedad (Rahier et al., 1987). Los mecanismos moleculares que median este depósito “celular-especifico” no han sido totalmente aclarados.

Se ha identificado la expresión pancreática de proteínas del ciclo del hierro que participan en la movilización del hierro a través de las membranas celulares, tales como DMT1 y ZIP14 (Koch et al., 2003; Nam et al., 2013). Además, las células endocrinas del páncreas expresan hepcidina, reguladora central del ciclo del hierro, lo que evidencia la relevancia regulatoria del ciclo del hierro en estas células (Kulaksiz et al., 2008). No obstante estos avances, solo se han aclarado parcialmente las vías moleculares que participan en la captación y regulación pancreática del exceso de hierro que produce el daño celular.

Por otro lado, resultados previos de nuestro grupo han caracterizado la distribución tisular del pro-péptido de hepcidina y su regulación en el tejido renal en un estado de alta demanda de hierro, como la anemia hemolítica (Veuthey et al., 2008). Esta identificación ha centrado nuestra atención en el estudio del ciclo del hierro en el riñón, para profundizar en el conocimiento del metabolismo del hierro renal.

La relación entre la enfermedad renal y el hierro se ha descrito en patologías renales que presentan aumento de los niveles de hierro de etiología diversa (Shah et al., 2007). En la bibliografía analizada se ha descrito que en pacientes con enfermedades renales, las células tubulares renales pueden estar expuestas a altas concentraciones de hierro debido al aumento de la filtración glomerular de hierro y de proteínas que contienen hierro, como la hemoglobina y la transferrina (Martines et al., 2013). Para explicar la sobrecarga de hierro renal, se han realizado estudios sobre la regulación renal de los transportadores FPN y DMT1 en exceso de hierro en cultivos celulares y en modelos animales (Wareing et al., 2003; Wolff et al., 2011). Sin embargo, estos autores no explican el depósito renal de hierro, debido a que observaron una menor importación de hierro, como resultado de la disminución de DMT1, y una mayor exportación, como consecuencia de la localización de FPN en membrana celular (Wareing et al., 2003; Wolff et al., 2011).

En este contexto, las vías moleculares que median la sobrecarga de hierro en este órgano no han sido aclaradas. Sin duda dilucidar la función regulatoria de hepcidina sobre el ciclo del hierro renal aportará mayor claridad a los mecanismos funcionales que vinculan el hierro con el riñón. La mejor comprensión de la acción del hierro en la lesión renal y como blanco terapéutico, requiere profundizar el conocimiento de las funciones de las proteínas que

participan en la movilización del hierro y en su regulación, incluyendo hepcidina, RTf1, ferroportina, ZIP14 y DMT1.

En el pulmón, la identificación de proteínas que participan en la absorción de hierro en el duodeno, ha despertado el interés de estudiar el ciclo del hierro en este órgano (Turi et al., 2004). Se ha descrito que elevados niveles de hierro tisular se asocian con un mayor riesgo de lesión pulmonar (Ghio, 2009; Bailie et al., 2013).

Dada la asociación descrita en la bibliografía entre el hierro y el pulmón, algunos estudios han evaluado la función pulmonar del importador DMT1 en la captación de hierro en sobrecarga, sugiriendo que DMT1 tiene la función de captar el exceso de hierro (Wang et al., 2002; Ghio et al., 2003). Sin embargo, la acción pulmonar de DMT1 en estados de alta demanda de hierro no ha sido determinada. A pesar de que se ha identificado la presencia del ARNm del importador ZIP14 en el pulmón, el estudio de su función en el ciclo del hierro pulmonar no ha sido abordado en profundidad (Wang C. Y. et al., 2012).

Otro relevante hallazgo en el pulmón fue la identificación de la expresión hepcidina en macrófagos alveolares aislados de ratón y en una línea celular bronquial (Nguyen et al, 2006; Frazier et al, 2011). Nguyen et al. (2006) documentaron la ausencia de regulación de hepcidina por hierro en macrófagos alveolares. Sin embargo, dado que Nemeth et al. (2003) demostraron una regulación diferencial de la síntesis de hepcidina en sistemas *in vivo* respecto de la observada en estudios *in vitro*, es esencial analizar los cambios regulatorios de la expresión de hepcidina pulmonar en modelos animales que presentan disfunción de la homeostasis del hierro.

De una revisión bibliográfica surge que el ciclo del hierro pulmonar no ha sido completamente dilucidado. Por ello es importante estudiar en forma integrada el comportamiento regulatorio entre hepcidina y las proteínas que movilizan hierro, como FPN, DMT1 y ZIP14, así como también, otras proteínas que intervienen en el balance del hierro en tejidos específicos.

El tejido nervioso no ha sido clásicamente relacionado con la homeostasis del hierro. Sin embargo, diversas proteínas que captan hierro (RTf1 y DMT1), que lo exportan (FPN) y que lo regulan (IRP1) han sido identificadas en células neuronales, demostrando la relevancia del ciclo del hierro en estas células (Moos, 1996; Moos et al. 2000; Zechel et al., 2006). Se ha descrito que el hierro y ciertos procesos inflamatorios se asocian a enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Parkinson, la Enfermedad de Alzheimer, la

Enfermedad de Huntington, entre otras (Sian-Hülsmann et al., 2011; Urrutia et al., 2014). Dado que el exceso de hierro es un fuerte promotor de estrés oxidativo, es de relevancia clínica investigar con más detalle la función potencial de la inflamación en la desregulación de la homeostasis del hierro en neuronas.

Recientemente se demostró que las citoquinas pro-inflamatorias inducen la expresión diferencial de los transportadores de hierro FPN y DMT1, produciendo acumulación de hierro en las neuronas (Urrutia et al., 2013). Sin embargo, los mecanismos regulatorios responsables de los cambios en los transportadores de hierro en neuronas no han sido totalmente aclarados.

El estudio de la regulación de los transportadores de hierro en células neuronales será relevante en la inflamación dado que la respuesta podría ser capaz de aumentar el hierro, agente etiológico que posiblemente desencadenaría los procesos neurodegenerativos.

Finalmente, luego de una intensa búsqueda bibliográfica surge que el estudio de la homeostasis del hierro se ha focalizado en comprender el ciclo del hierro en tejidos relacionados con patologías humanas estrechamente vinculadas a la dishomeostasis del biometal. Sin embargo, no se han llevado a cabo análisis que realicen un estudio integrativo de las vías de importación, exportación y regulación del biometal, que permitan comprender la regulación del ciclo del hierro en estos tejidos en estados de balance y desbalance el hierro.

El empleo de modelos animales con inducción de situaciones fisiopatológicas relacionados con la dishomeostasis del hierro, facilita el estudio de la regulación de proteínas del ciclo del hierro y permite profundizar las bases moleculares de los mecanismos involucrados. El ratón es el modelo animal de elección para los estudios sobre el metabolismo del hierro sistémico y tisular debido a que esta especie posee, al igual que los humanos, una compleja red de proteínas que regulan la captación y distribución del hierro en el organismo (Ganz & Nemeth, 2006; Lopes et al., 2010).

A partir de lo expuesto, surge que si bien se produjeron avances en el estudio de las proteínas del metabolismo del hierro, quedan por esclarecer aspectos funcionales y regulatorios de los procesos que movilizan el hierro en los tejidos pancreático, renal, pulmonar, nervioso, duodenal y hepático en situaciones fisiológicas y fisiopatológicas relacionadas con el desbalance del ciclo de hierro. En este sentido, el enfoque de este trabajo de tesis contribuirá al conocimiento de la expresión de proteínas claves de la ruta

Introducción

del hierro como hepcidina, FPN, DMT1, ZIP14, RTf1, HFE y ferritina, en tejidos tradicionalmente asociados al ciclo del hierro, como así también en tejidos cuya asociación con el ciclo del hierro ha sido recientemente descripta. De esta forma se avanzará en el conocimiento sobre la regulación del ciclo del hierro en situaciones fisiopatológicas análogas a las observadas en humanos, intentado dilucidar las relaciones funcionales y regulatorias de las proteínas del hierro.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1.1. Cepas de ratones

En el presente trabajo de tesis se utilizaron ratones hembras adultas cepa CF1 de tres semanas de edad (25 ± 5 g de peso corporal). Esta cepa posee variabilidad genética conservada y estabilidad fenotípica (Oyarzabal, 2011).

Los ratones fueron obtenidos, criados y mantenidos en el Bioterio de la Universidad Nacional del Sur.

1.2. Aprobación Ética

Antes de iniciar cada estudio, los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la Universidad Nacional del Sur (Resolución CDBBF 791/14: números de protocolos 026/2014 y 027/2014). Los procedimientos seguidos 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, 1996).

1.3. Dietas y condiciones ambientales

Los ratones CF1 fueron alimentados "*ad libitum*" con una dieta estándar de mantenimiento y calidad certificada (Ganave ratas y ratones, Alimentos Pilar SA, Argentina). Esta dieta contiene cantidades normales de hierro, 270 ppm.

Los animales se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada de 21 ± 2 °C (Banda de temperatura óptima para ratón: 19-23°C) y bajo una humedad relativa de 55 ± 10 % (Bligh, 1973). Los animales se alojaron en habitaciones con un ciclo artificial de 12 horas de iluminación y 12 horas de oscuridad, siempre en el mismo horario (Hastings, 1976). Se colocaron en jaulas de plástico de policarbonato, claro y autoclavable, con piso y paredes sólidas. Para que los ratones se adapten al entorno, diez días antes del inicio de cada experimento, los animales fueron colocados en jaulas (6 ratones por jaula), siguiendo la Guía para el cuidado de animales de laboratorio y su uso para propósitos científicos I. Vivienda y Cuidado (UFAW ROYAL SOCIETY, 1987).

1.4. Método de extracción sanguínea

Los factores que deben tenerse en cuenta para la recolección sanguínea son: anestésico a utilizar y método de obtención de la muestra. Para la obtención de muestras sanguíneas fue utilizada la extracción del plexo submandibular, y para la inducción de deficiencia de hierro por hemorragia crónica, se empleó el método de extracción sanguínea del seno reto-orbital bajo anestesia.

1.4.1. Anestesia

Se utilizó la vía inhalatoria. El anestésico volátil elegido fue el isoflurano que induce cortos períodos de anestesia en forma rápida y produce relajación muscular debido a su efecto depresor sobre el sistema nervioso central. **Inducción:** Se coloca el animal en la cámara de inducción anestésica regulando el vaporizador a 4-5% de isoflurano.

1.4.2. Extracción del plexo submandibular

El ratón se sujeta firmemente de manera que su cabeza quede alineada con el cuerpo, y se comprime ligeramente los vasos del cuello del lado opuesto al que se va a realizar la punción. Posteriormente se localiza el sitio de punción, el cual es una pequeña zona circular desprovista de pelo situada centralmente en la mandíbula inferior. La punción se realiza inclinando dorsalmente 1-2 mm la aguja de 21 G, siendo la profundidad óptima de punción de 2-3 mm. Luego, se recoge la gota de sangre en un eppendorf con anticoagulante. Al finalizar la extracción y soltar el ratón, el sangrado se detendrá automáticamente (Golde et al., 2005).



Figura 7. Localización del plexo submandibular (Golde et al., 2005).

1.4.3. Extracción del seno retro-orbital

A causa de los volúmenes de extracción requeridos para lograr la inducción de anemia y deplecionar de hierro los depósitos tisulares, debimos utilizar el método de extracción sanguínea del seno retro-orbital para realizar la flebotomía, al igual que diversos autores (Brain et al., 2006; Lasocki et al., 2008; Krijt et al., 2010; Chiabrande et al., 2013; Casanovas et al., 2013; Kuzmac et al., 2014; Yien et al., 2015).

Una vez anestesiado el ratón, se sujeta al animal y estirando la piel del cuello hacia atrás, asegurándose de no dificultar su respiración (Hoff, 2000). Posteriormente se inserta un capilar heparinizado en el ángulo externo del ojo, girando suavemente hasta que la sangre comienza a fluir en el interior del capilar. Al finalizar la extracción, es fundamental oprimir ligeramente la zona con algodón seco para realizar la hemostasia. Es imperioso comprobar que la recuperación del ratón de la anestesia se produjo adecuadamente.

1.5. Disección de tejidos

1.5.1. Eutanasia y necropsia

La eutanasia fue realizada por el método de dislocación cervical. Para realizar esta técnica se presiona una varilla junto a la base del cráneo y se tira rápidamente de la base de la cola; esto produce la separación entre las vértebras cervicales y el cráneo produciendo la muerte de animal.

Es de suma importancia verificar posteriormente que se ha producido la muerte del ratón. Para ello, se deben evaluar los siguientes signos: ausencia de ventilación pulmonar y latido cardíaco, ausencia de reflejos, midriasis, cianosis de las mucosas y pérdida del control de esfínteres.

Para realizar la necropsia, el ratón es colocado en posición decúbito dorsal sobre una plancha de telgopor, sujetándolo a la misma por sus extremidades. La zona donde se realizará la incisión debe ser descontaminada con abundante alcohol. Luego, se realiza una incisión en la piel efectuando un corte en la región abdominal que se extiende hasta el mentón. Posteriormente, se realiza un segundo corte desde donde comenzamos el primero hacia las extremidades inferiores del animal, formando como una Y invertida. Con la cavidad

abierta, se extraen los órganos de estudio: hígado, bazo, duodeno, riñón, pulmón y páncreas.

Las piezas anatómicas obtenidas mediante esta técnica que son procesadas para inmunohistoquímica, se fijan durante 24 horas con Formaldehído. Para estudios de *western blot* las piezas de tejido se freezan a -80°C hasta su posterior análisis.

1.6. Vía de administración de sustancias

La vía de administración intraperitoneal fue utilizada en nuestros experimentos. Para el procedimiento experimental, se toma al ratón por el lomo y se invierte su posición de manera que el vientre quede expuesto. Posteriormente, se inclina caudalmente al animal y se traza imaginariamente una línea que cruce su abdomen transversalmente. Luego de limpiar la zona con alcohol 70%, se inserta una aguja (en un ángulo de unos 45° aprox.) lo más cerca posible a la línea que divide al abdomen longitudinalmente. El calibre de la aguja utilizada fue el recomendado, 27 G. Primero se ingresa por el subcutáneo y luego a la cavidad abdominal inclinando la aguja aproximadamente en un ángulo de 90° . Posteriormente, se retrae el émbolo para asegurarse de no haber ingresado en ningún vaso y luego, si ningún fluido es aspirado, se inyecta la solución o droga. Al terminar, se retira la aguja lentamente para no lesionar los órganos internos.

2. MODELOS *IN VIVO*

2.1. Modelo de Sobrecarga de Hierro. En el grupo *sobrecarga de hierro*, los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de 500 μl de Hierro-Sacarato (*Laboratorio Rivero*) en los días 0, 5, 10 y 15 (dosis total 1,3 g/kg). En el grupo *adecuado hierro* (control), los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de 500 μl de solución fisiológica (0.9% NaCl) en los días 0, 5, 10 y 15. El día 20 se realizó la extracción de sangre para determinar los parámetros hematológicos y la ferremia y, luego, se sacrificaron los animales y se obtuvieron los tejidos para cuantificar el hierro tisular y realizar técnicas inmunohistoquímicas y de *Western blot*.

2.2. Modelo de Deficiencia de hierro. En el grupo *deficiencia de hierro*, aproximadamente 500 μ L de sangre fueron extraídos con capilares heparinizados cada 5 días durante 25 días mediante extracción sanguínea del seno retro-orbital bajo anestesia. En el *grupo control*, los ratones fueron anestesiados y manipulados cada 5 días durante 25 días sin realizar extracción sanguínea (operación simulada). El día 30 se realizó la extracción de sangre para determinar los parámetros hematológicos y la ferremia y, luego, se sacrificaron los animales y se obtuvieron los tejidos para cuantificar el hierro tisular y realizar técnicas inmunohistoquímicas y de *Western blot*.

3. MODELOS *IN VITRO*

3.1. Células SH-SY5Y

En el presente trabajo de tesis se utilizaron células de neuroblastoma SH-SY5Y (CRL-2266; American Type Culture Collection, Rockville, MD).

3.2. Células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1 (Clon 9)

Se obtuvo shRNA contra IRP1 humano (hIRP1) (nombre del gen: AGO1) utilizando “The RNAi Consortium (TRC)” de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). El constructo TRCN0000056554, cuya secuencia blanco es 5`GCAGGATTGTTAGCAAAGAAA3` fue insertado en un vector puro pLKO.1 (Mission®, Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de iniciar la transfección, el vector fue linealizado usando la enzima de restricción Scal (New England Biolabs). Las células SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) fueron transfectadas con el vector linealizado usando Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). Los transfectantes estables fueron seleccionados en presencia de 1 μ g/ml de puromicina. Células transfectadas con el vector sin shRNA contra IRP1 humano son utilizadas como controles (Células Puras).

3.3. Condiciones de cultivo

Las células SH-SY5Y y los clones SH-SY5Y *knockdown* para IRP1, se cultivan a 37 °C en 5% CO₂ en medio MEM-F-12 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino, aminoácidos no esenciales, mezcla de antibiótico-antimicótico y 20 mM de tampón HEPES. La concentración total de hierro en este medio de cultivo fue 7,02 μM determinado por espectrometría de absorción atómica. Los clones SH-SY5Y *knockdown* para IRP1 y los controles de transfección se cultivaron también con 1 μg/ml de puromicina.

En todos los casos, el medio fue cambiado día por medio.

3.4. Protocolos experimentales

3.4.1. Tratamientos de células SH-SY5Y con estímulos inflamatorios y con N-acetilcisteína

Las células SH-SY5Y se incuban durante 30 minutos en presencia o ausencia del antioxidante N-acetilcisteína (2mM). Luego las células se tratan durante 18 h con: 50 ng/mL Factor de Necrosis Tumoral α (TNF-α) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 50 ng/mL Interleuquina 6 (IL-6) (R&D Systems), 1 μg/mL de Lipopolisacárido de Escherichia coli 026:B6 1 (LPS) (Sigma-Aldrich: St. Louis, MO, USA) o solución salina.

Las condiciones experimentales fueron: 1) Control: incubación con solución salina; 2) TNF-α: incubación con TNF-α; 3) IL-6: incubación con IL-6; 4) LPS: incubación con LPS; 5) NAC: incubación con NAC; 2) NAC + TNF-α: incubación con NAC y TNF-α; 3) NAC + IL-6: incubación con NAC e IL-6; 4) NAC + LPS: incubación con NAC y LPS.

3.4.2. Tratamientos de células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1 con estímulos inflamatorios

Células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1 (Clon 9, C9) y células transfectadas con el vector puro (Puras, P) se tratan durante 18 h con: 50 ng/mL TNF-α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 50 ng/mL IL-6 (R&D Systems), 1 μg/mL LPS de Escherichia coli 026:B6 1 (Sigma-Aldrich: St. Louis, MO, USA), o solución salina.

Las condiciones experimentales fueron: **1)** SH-SY5Y *knockdown* para IRP1 (Clon 9, C9): a) Clon 9 TNF-α: incubación de las células *knockdown* para IRP1 con TNF-α; b) Clon 9 IL-6:

incubación de las células *knockdown* para IRP1 con IL-6; c) Clon 9 LPS: incubación de las células *knockdown* para IRP1 con LPS d) Clon 9 Control: incubación de las células *knockdown* para IRP1 con solución salina. **2)** SH-SY5Y transfectadas con el vector puro (Puras, P): a) Puras TNF- α : incubación de las células transfectadas con el vector puro con TNF- α ; b) Puras IL-6: incubación de las células transfectadas con el vector puro con IL-6; c) Puras LPS: incubación de las células transfectadas con el vector puro con LPS; d) Células Puras Control: incubación de las células transfectadas con el vector puro con solución salina.

4. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

4.1. Hematocrito

El hematocrito (HCT) se define como la relación entre el volumen de eritrocitos y el volumen de sangre total. Se expresa como un porcentaje o como una fracción decimal. La técnica utilizada en nuestras experiencias permitió valorar el HCT de forma directa.

Para el procedimiento experimental se utilizan tubos capilares heparinizados (micro-hematocritos) que se cargan por capilaridad hasta las $\frac{3}{4}$ partes de su longitud. Luego se obtura uno de los extremos con plastilina y se centrifuga a alta velocidad durante 5 minutos en microcentrífuga. Utilizando un ábaco se mide la longitud total de la columna (glóbulos rojos y plasma) y la longitud de la columna de glóbulos rojos, expresando el resultado en %. Intervalo de referencia en ratón: 42-50 %.

4.2. Hemoglobina

La concentración de hemoglobina (Hb) se mide en muestras de sangre entera empleando el método de la cianometahemoglobina. Este método consiste en determinar el contenido de Hb en una muestra sanguínea luego de la lisis de las células. Posteriormente, la Hb liberada se oxida a metahemoglobina por acción del ferrocianuro. La metahemoglobina en presencia de iones cianuro a pH 7,2 se convierte en cianometahemoglobina, compuesto estable durante 24 hs que se mide a 540 nm.

Para la determinación de Hb se toma una alícuota de sangre entera y se contacta con el reactivo de Drabkin que contiene detergente, ferrocianuro de potasio y cianuro de potasio (*WM Argentina*). Luego de mezclar por inversión e incubar durante 5 minutos, se lee la

absorbancia en fotocolorímetro a una longitud de onda de 540 nm. Para calcular la concentración de Hb se tiene en cuenta la absorbancia obtenida de un testigo de Hb provisto por el Kit cuya concentración es conocida (*WM Argentina*). Intervalo de referencia en ratón: 13,0 – 15,0 g/dL.

4.3. Reticulocitos

El recuento de reticulocitos se lleva a cabo sobre extendidos sanguíneos teñidos con azul brillante de cresilo, colorante supravital. Este colorante precipita el ARN polirribosomal presente en el citoplasma de los eritrocitos inmaduros, reticulocitos. Mientras que los eritrocitos adquieren una coloración verdosa, los restos de ARN presentes en los reticulocitos se observan como un precipitado azul reticular. Pueden observarse diferentes grados de abundancia y tamaño del precipitado dependiendo del grado de maduración del reticulocito.

Para realizar la coloración se mezclan partes iguales de sangre entera y de colorante azul brillante de cresilo. Luego de una incubación de 30 minutos, se realizan los extendidos sobre portaobjetos. El recuento de reticulocitos se realiza con microscopio óptico con objetivo 100 X en campos elegidos al azar. Se debe contar la cantidad de reticulocitos sobre 1000 eritrocitos totales y se expresa el resultado en %. Intervalo de referencia en ratón: 0-4%.

5. DETERMINACIÓN DEL ESTADO DEL HIERRO

5.1. Hierro plasmático

En la técnica fotométrica para la determinación de hierro en plasma, primero se libera el hierro del complejo hierro-transferrina en medio ácido y, luego, se reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} con ácido ascórbico. Seguidamente, el Fe^{2+} reacciona con el reactivo de color, ferene, dando un complejo azul que se mide a 600 nm (*Fer-color, Wiener Lab*). La absorbancia obtenida es directamente proporcional a la concentración de hierro.

Como muestra biológica fue utilizado plasma de ratón obtenido de sangre anticoagulada con heparina.

5.2. Hierro tisular

5.2.1. Evaluación cuantitativa

Para realizar la cuantificación de la concentración de hierro hepático, en primer lugar se debe lavar el tejido con solución fisiológica para eliminar el contenido de sangre que contiene el tejido y evitar la sobreestimación del contenido de hierro a causa de la medición del hierro tisular sumado al hierro de los eritrocitos presentes en la sangre que contiene el órgano (Beilby et al., 1999). Para ello, se sacrifica al animal, se expone la cavidad peritoneal y se introduce una cánula en un vaso sanguíneo de gran calibre que se dirige hacia el hígado. Luego de cortar la arteria esplénica, se permite el paso de una cantidad suficiente de solución fisiológica hasta que el hígado tome una tonalidad marrón clara y se extrae una pieza para la cuantificación de hierro. Posteriormente, se extraen los siguientes tejidos para realizar la cuantificación: bazo, pulmón, riñón y páncreas. Las piezas de tejido se congelan a -20°C hasta su análisis.

Para la cuantificación de hierro tisular, un segmento de los órganos hígado, riñón, pulmón, bazo y páncreas se secan en estufa durante 8 horas. Luego, se realiza una digestión ácida del tejido con Ácido Nítrico 35% a 70°C . Posteriormente, se realiza la determinación colorimétricamente adaptando el kit comercial para la determinación de hierro plasmático a la determinación de hierro tisular. El método consiste en la liberación del Fe^{3+} en medio ácido. Una vez liberado, se reduce a Fe^{2+} en presencia de un reductor, el ácido ascórbico. Seguidamente reacciona con el reactivo de color, ferene, dando un complejo color azul que se mide a 600 nm (*Fer-color, Wiener lab*).

Luego de corregir las lecturas con sus blancos correspondientes, se calcula la concentración de hierro en las muestras de tejido.

5.2.2. Evaluación cualitativa

La hemosiderina es un pigmento de color amarillo pardo derivado de la ferritina. Dicho pigmento, contiene hierro en forma de hidróxido férrico y aparece como acúmulos o granulaciones generalmente situadas en el interior de macrófagos (García del Moral, 1993). La hemosiderina puede colorearse mediante la técnica del azul de Perl's por contener Fe^{3+} libre (Perls, 1867). La tinción de Perl's se basa en la propiedad que tiene el ferrocianuro de

potasio de transformarse, en presencia de Fe^{3+} , en ferrocianuro férrico o azul de Prusia, de color azul, empleando ácido clorhídrico como desencadenante de la reacción. Esta técnica histoquímica permite detectar el hierro no unido a proteínas.

El procedimiento experimental consiste en desparafinar con xilol los cortes de tejido de 5 μm incluidos en parafina y rehidratarlos empleando una batería de alcoholes de graduación decreciente (100°, 96°, 70°, 50°) hasta llegar al agua destilada. Para la detección del hierro en forma de hemosiderina los cortes se incuban con ferrocianuro de potasio 10% durante 4 minutos y luego con la solución de trabajo: ferrocianuro de potasio 10% y HCl 2% (1:1). Finalmente, los cortes se contrastan con Rojo Nuclear (1%) y se deshidratan empleando una batería de alcoholes de graduación creciente (50°, 96°, 100°) hasta llegar al xilol. Los cortes teñidos se montan utilizando Bálsamo de Canadá. El hierro en forma de hemosiderina se visualiza de color azul y los núcleos presentan coloración rosa.

6. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS EN TEJIDOS

6.1. Caracterización e identificación de los segmentos del túbulo proximal en el riñón

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.

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):

- 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.

7. ANTICUERPOS

7.1. Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Características	Dilución IHQ	Dilución WB	Tiempo de incubación	Proveedor
DMT1	Conejo anti-ratón	1/250	1/500	1 hora T ambiente	Cedido por Canonne Hergaux (Canonne-Hergaux et al., 1999)
FPN	Conejo anti-ratón	1/200	1/1000	Overnigth 4°C	Cedido por Knutson (Knutson et al., 2005)
ZIP14	Conejo anti-ratón	10µg/ml	4µg/ml	Overnigth 4°C	Cedido por Cousins J (Liuzzi et al., 2005)
RTf1	Conejo anti-ratón	1/100	1/200	Overnigth 4°C	Santa Cruz Biotechnology
HFE	Conejo anti-ratón	1/100	1/3000	Overnigth 4°C	Cedido por Fleming R (Parkkila et al., 1997)
Prohepcidina	Conejo anti-humano	1/500		Overnigth 4°C	Cedido por Ganz T (Valore & Ganz, 2008)
Ferritina	Conejo anti-ratón	1/500		Overnigth 4°C	Cedido por Santambrogio P (Santambrogio et al., 2000)
Actina	Cabra anti-ratón		1/5000	1 hora T ambiente	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH	Conejo anti-ratón		1/1000	1 hora T ambiente	Cell Signaling Technology

Tabla 1. Anticuerpos primarios: diluciones y tiempos de incubación.

7.2. Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Dilución IHQ	Dilución WB	Tiempo de incubación	Proveedor
Anti-ratón, conjugado con HRP	1/100	1/2000	1 hora T ambiente	Alpha Diagnostic
Anti-cabra, conjugado con HRP	-	1/5000	1 hora T ambiente	Santa Cruz Biotechnology

Tabla 2. Anticuerpos secundarios: diluciones y tiempos de incubación.

8. INMUNOHISTOQUÍMICA

8.1. Fundamento

Los métodos inmunohistoquímicos utilizan como principio la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo, que se ponen en evidencia empleando diferentes métodos (Boenisch, 2002). Para visualizar el sitio de unión antígeno-anticuerpo es preciso emplear un trazador. Las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas en nuestras experiencias, son técnicas de inmunolocalización que utilizan una enzima como trazador del marcaje. Por este motivo, el lugar de la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo el sustrato de la enzima junto con un cromógeno. El producto originado, por acción de la enzima sobre el sustrato, interacciona con el cromógeno y da lugar a un compuesto coloreado. En nuestro caso utilizamos la enzima peroxidasa como trazador. Las técnicas de inmunoperoxidasa tienen en común la utilización de la enzima peroxidasa acoplada a un anticuerpo, ya sea el primario o el secundario (Boenisch, 2002).

En nuestros estudios utilizamos el método directo de detección, que se basa en la unión de un anticuerpo primario con el antígeno de interés en el tejido y la posterior detección, utilizando un anticuerpo secundario marcado con enzima peroxidasa dirigido contra el anticuerpo primario. La localización del antígeno de interés se revela mediante el agregado de la solución sustrato de la enzima y de su cromógeno.

8.2. Procedimiento experimental

8.2.1. Procesamiento de tejidos

8.2.1.1. Fijación: Para la fijación de tejidos fue utilizado formol buffereado debido a su rápida penetración, bajo costo, fácil preparación y por la adecuada conservación de estructuras tisulares e intracitoplasmáticas. El formaldehído reacciona principalmente con aminoácidos básicos para formar uniones cruzadas de puentes de metileno. En esta fijación se rompen los enlaces débiles, se forman enlaces covalentes y se remueven átomos de hidrógeno que son reemplazados por el mismo fijador. El fijador contiene formalina (formaldehído al 37-40% p/v) y un sistema buffer que permite mantener el pH de la solución. Esta solución es estable durante muchos meses a temperatura ambiente. Pequeños bloques de tejido, de 10x10x3mm aproximadamente, fueron fijados durante 24 horas para inmunohistoquímica y se utilizaron 15 a 20 volúmenes de fijador por cada volumen del bloque tisular. Para preparar 1 litro de formol-buffer 10% se utilizó: fosfato sódico monobásico (4 g/L), fosfato sódico dibásico (6,5 g/L) y formol (100 mL/L).

8.2.1.2. Inclusión y cortes del material en micrótomo: Luego de la fijación del material en formol buffereado, se procede a la inclusión en un material para poder realizar cortes histológicos. El fijador es acuoso e impide la penetración de la parafina. Por ello, es necesario realizar una deshidratación del tejido para poder incluirlo en parafina. Esto se realiza sumergiendo las piezas en líquidos anhidros de graduación creciente (50°, 96°, 100°) y, luego, se sumergen en tolueno durante 1 hora. Por último los tejidos son incluidos en parafina durante 2 horas y posteriormente se realiza el entacado del material tisular en cassettes histológicos. Utilizando un micrótomo tipo Minot (Leica) se realizaron cortes de 5 µm de espesor.

8.2.2. Inmunodetección

El procedimiento experimental consiste en desparafinar con xilol los cortes de tejidos incluidos en parafina e hidratarlos utilizando alcoholes en graduación decreciente (100°, 96°, 70°, 50°) hasta llegar al lavado con buffer PBS, pH: 7.0-7.2 (en g/L: NaCl 7; KCl 0,2; KH₂PO₄ 0,43; Na₂HPO₄ 1,48).

En todos los casos, debido a que algunos tejidos contienen peroxidasa endógena, es necesario realizar un pre-tratamiento con solución saturada de peróxido de hidrógeno que

Materiales y Métodos

inactiva a la peroxidasa endógena en forma irreversible, evitando la aparición de falsos positivos. Luego del bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3 %, se realiza un lavado con buffer PBS. Para ZIP14, se realiza recuperación de epitopes con buffer citrato de sodio pH 6.0- 0,05% Tween 20 a 95-100°C durante 10-20 minutos. Posteriormente, los cortes se bloquean con BSA 1% (albúmina sérica bovina) y se incuban con el anticuerpo primario. Este tiempo de incubación depende del anticuerpo utilizado. Luego de lavar con buffer PBS, los cortes se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente.

El revelado se realiza observando al microscopio y agregando 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*). Se mantiene en contacto con el revelador hasta que la intensidad de color sea la adecuada; este tiempo de revelado depende tanto del anticuerpo utilizado como del tejido (Tabla 3). Por último, los cortes son contrastados con hematoxilina y deshidratados mediante una batería de alcoholes de graduación creciente (50°, 96°, 100°) hasta llegar al xilol. Por último, los cortes son montados empleando bálsamo de Canadá.

Para el procesamiento de los *controles negativos* se reemplaza en anticuerpo primario por buffer PBS. En nuestras experiencias, la inmunomarcación fue analizada utilizando un microscopio BX51 (Olympus, Tokio, Japón) equipado con objetivos secos (x10, x20, x40) y un objetivo de inmersión en aceite (x100). Las imágenes se adquirieron utilizando una cámara Olympus C7070 acoplada al microscopio óptico.

	<i>DMT1</i>	<i>ZIP14</i>	<i>RTf1</i>	<i>Ferritina</i>	<i>Prohepcidina</i>	<i>HFE</i>	<i>FPN</i>
Duodeno	45''						
Hígado	1' 30''			2'	2'		
Pulmón	2'	3'		2' 30''	3'	4'	3'
Páncreas	3'			2'	3'		
Riñón	2'	2' 30''	3'	1' 30''	2'		

Tabla 3. Tiempos de revelado según el tejido y el anticuerpo

9. TÉCNICA DE DOBLE TINCIÓN

9.1. Fundamento

En los tejidos que presentan elevados depósitos de hemosiderina, la identificación de proteínas por inmunohistoquímica por la técnica de la inmunoperoxidasa es compleja, ya que la inmunomarcación adquiere una coloración similar a la hemosiderina. Por ello, en nuestro laboratorio se desarrolló una técnica de doble tinción, para identificar simultáneamente la presencia de hemosiderina y de proteínas por inmunohistoquímica. En este método, se combinaron las técnicas de inmunoperoxidasa-DAB y la de azul de Prusia para depósitos férricos (Tinción de Perl's; Perls, 1867). Esta técnica de doble marcación nos permite diferenciar la presencia de hemosiderina (azul) de la inmunomarcación proteica (marrón). Los tejidos son contrastados con rojo nuclear.

9.2. Procedimiento experimental

Para la técnica de doble marcación se siguió el siguiente protocolo:

- Desparafinización de cortes con Xilol.
- Hidratación en alcoholes de graduación decreciente (100°, 96°, 70°, 50°) hasta llegar al lavado con buffer PBS (pH=7,2).
- Inactivación de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% y lavado con buffer PBS (pH=7,2).
- Recuperación de epitopes para la detección de ZIP14 con buffer citrato de sodio pH 6.0- 0,05% Tween20 a 95-100°C durante 10-20 minutos.
- Lavado con buffer PBS (pH=7,2) y bloqueo con BSA 1%.
- Incubación con Anticuerpo Primario y lavado con buffer PBS (pH=7,2).
- Incubación con Anticuerpo Secundario y lavado con buffer PBS (pH=7,2) durante una hora.
- Incubación con Ferrocianuro de potasio 10%.
- Incubación con solución 1:1 de Ferrocianuro de potasio 10% y Ácido clorhídrico 2%.

- Lavado con agua destilada e incubación con rojo nuclear durante 45 segundos.
- Deshidratación en alcoholes de graduación creciente (50°, 96°, 100°).
- Aclaración con xilol y montaje con Bálsamo de Canadá.

10. WESTERN BLOT

10.1. Fundamento

El método de *Western blot* es una técnica empleada para detectar proteínas específicas en una muestra que contiene una compleja mezcla de proteínas, como los homogenados tisulares o celulares (De La Fuente González et al., 2007). Dichas proteínas se separan mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en función de uno o varios (electroforesis bidimensionales) de los siguientes criterios: punto isoeléctrico, peso molecular y carga eléctrica.

La técnica de SDS-PAGE, utiliza agentes desnaturalizantes que provocan la pérdida de las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas y las recubren con cargas negativas. De este modo, la estructura tridimensional de las proteínas no influye en la electroforesis, y pueden separarse en función de su peso molecular. Luego de transferir las proteínas separadas desde el gel a una membrana adsorbente, se realiza la inmunodetección empleando un anticuerpo primario específico y un anticuerpo secundario marcado con un trazador (De La Fuente González et al., 2007). En nuestras experiencias, utilizamos la enzima peroxidasa como trazador del marcaje, visualizando la unión antígeno-anticuerpo mediante el empleo de un sustrato quimioluminiscente altamente sensible que permite la detección del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa.

10.2. Procedimiento experimental

10.2.1. Preparación de homogenados

10.2.1.1. Homogenados tisulares: Para la obtención de homogenados de tejidos, se extrae una pequeña pieza tisular que se freeza a -80°C hasta su análisis. Posteriormente, las muestras congeladas a -80°C, se descongelan para realizar la homogenización, agregando 0,5 ml de buffer lisis con la siguiente composición por muestra: 50 mM Tris-HCl; 150 mM

NaCl, 1 mM EDTA, 1% Tween 20; 1% Triton X100 e inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

La homogenización se realiza con ultraturrax, a máxima velocidad durante unos segundos, manteniendo el tejido a 4°C. Posteriormente, se agregan 0,5 mL de buffer lisis con inhibidores y los homogenados se centrifugan a 13.000 g durante 15 minutos a 4°C. Luego se toma el sobrenadante y se freezan a -80°C hasta su posterior análisis.

10.2.1.2 Homogenados celulares: Para la obtención de homogenados de células para Western blot, se elimina el medio de las placas de cultivo y se lavan 2 veces con buffer PBS frío. Luego de retirar completamente el PBS, se agrega 100 µl de buffer lisis compuesto por: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% desoxicolato de sodio, e inhibidor de proteasa (*Sigma-Aldrich*). Posteriormente, se recolectan las células con *scraper*, se incuba durante 15 minutos en hielo y se centrifuga a 12000 g durante 15 minutos. Luego, se toma el sobrenadante y se freezan a -80°C hasta su posterior análisis.

10.2.2. Cuantificación de proteínas

10.2.2.1. Ácido bicinonínico: La concentración de proteínas de los homogenados celulares fue realizada mediante el ensayo de proteínas con ácido bicinonínico (BCA). La reacción está basada en la reducción del Cobre²⁺ a Cobre¹⁺ en presencia de proteínas en medio con pH alcalino, y la posterior detección colorimétrica del catión cuproso utilizando BCA como solución de trabajo. La sal sódica BCA, es un compuesto que forma un complejo púrpura intenso con iones Cu¹⁺ en medio alcalino (*Thermo Scientific-Pierce*).

Para el desarrollo de la reacción se incuba durante 30 minutos a 37°C. La absorbancia se mide a 562 nm. La cantidad de Cu²⁺ reducida es proporcional a las proteínas totales y se determina en función de una curva estándar de concentración creciente de proteínas realizada a partir de albúmina sérica bovina (1 mg/ml).

10.2.2.2. Bradford: La concentración de proteínas de los homogenados tisulares, fue realizada mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). El reactivo de Bradford contiene el colorante Azul de Coomassie G-250, el cual cambia de color rojo a azul cuando se une a residuos aromáticos y arginina de las proteínas. La absorbancia del complejo proteína-colorante se lee a 595 nm. La concentración de proteínas se determina en función de una

curva estándar de concentración creciente de proteínas realizada a partir de albúmina sérica bovina (1 mg/ml).

10.2.3. Electroforesis de proteínas

Para la separación de proteínas se realiza electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (*SDS-PAGE*). *SDS-PAGE* es una técnica que consiste en separar proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Laemmli, 1970). En este tipo de electroforesis, las proteínas se desnaturalizan con β -mercaptoetanol, que destruye puentes disulfuro, calor y SDS (detergente anfipático) que desnaturaliza y recubre las proteínas con cargas negativas. Posteriormente, las proteínas se separan en función del peso molecular en gel de acrilamida-bisacrilamida al 12%.

Para la preparación de proteínas, se extrae el volumen de muestra necesario para cargar 30 μg de proteínas de los homogenados celulares y 100 μg de proteínas de los homogenados tisulares. Luego se agrega un volumen determinado de buffer muestra Laemmli (SDS 4%; Glicerol 20%; Azul de bromofenol 0.02%; Tris 0.125 mM).

Se utilizó un marcador de peso molecular de amplio rango: 12- 225 kDa (*Full range marker rainbow*, Amersham GE).

La electroforesis se realiza a voltaje constante de 80 voltios hasta que las muestras lleguen al gel de resolución (TRIS base-Glicina, SDS 1%), para mejorar la resolución de las bandas. Luego, se cambia el voltaje a 100 voltios durante 1h 20 minutos hasta finalizar la corrida, en buffer de corrida (TRIS base-Glicina, SDS 1%).

10.2.4. Transferencia de proteínas

Luego de finalizar la electroforesis, las proteínas separadas por peso molecular se transfieren del gel a una membrana de polivinilideno-difluoruro (PVDF) (Inmobilon-P, 0,45 μm , *Millipore Corporation*). Antes de la transferencia, las membranas se activan sumergiéndolas en metanol puro durante 30 segundos y se equilibran en buffer de transferencia durante 5 minutos. La transferencia se realiza aplicando una corriente constante de 300 mA durante 1 hora 30 minutos en buffer de transferencia (Tris-Glicina; Metanol 100% al 20%; SDS 10% al 0,1%) dentro de una cuba de hielo.

10.2.5. Bloqueo de uniones inespecíficas

Antes de la incubación con el anticuerpo primario, es preciso bloquear los sitios de la membrana que han quedado libres tras la transferencia, para evitar que el anticuerpo se una inespecíficamente. Para ello, se incuba la membrana con una solución de proteínas. En nuestro caso, incubamos la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5% en buffer TBS (Tris 50 mM pH: 7,2-7,4; NaCl 200 mM) conteniendo 0,05% de Tween-20 (TBS-T 0,05%).

10.2.6. Inmunodetección

Por último, mediante el empleo de anticuerpos específicos se realiza la inmunodetección de la proteína de interés. Luego de realizar el bloqueo de la membrana, se agrega el anticuerpo primario (anti-ratón hecho en conejo): anti-FPN, anti-HFE, anti-RTf1, anti-prohepcidina, anti-IRP1 y anti-ZIP14, en TBS-T conteniendo 1% de leche descremada, durante toda la noche a 4 °C en agitación suave constante y 1 h a temperatura ambiente para anti-DMT1. Una vez cumplido el tiempo de incubación, el exceso de anticuerpo primario es eliminado lavando la membrana, tres veces durante 5 minutos, con TBS-T 0,1%. Posteriormente, la membrana se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa en TBS-T 0,1% conteniendo 1% de leche descremada. Luego, el exceso de anticuerpo secundario se elimina mediante tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T 0,1%. Seguidamente, la membrana se incuba durante 2 minutos con una mezcla de reactivos del *kit* comercial de electroquimioluminiscencia (*Supersignal West Pico Chemiluminiscent substrate, Thermo Scientific*) que contiene luminol y peróxido de hidrógeno. La señal de electroquimioluminiscencia se detecta mediante la exposición de la membrana con films durante 1-20 minutos, este tiempo de exposición depende de la intensidad de la señal emitida por las bandas. Los films se escanean (HP Scanjet G3110) y se procesan con el software ImageJ (Image J 1,47h, Wayne Rasband National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Para realizar el control de carga, utilizamos como proteína de referencia: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y actina.

10.2.7. Reutilización de membranas

Para reutilizar las membranas, el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana se disocia bajo condiciones de astringencia con agentes reductores, detergentes y temperatura que no afectan las propiedades de la membrana. En nuestro caso, utilizamos el buffer de *stripping* compuesto por: 15 g/l Glicina, SDS 10% al 1%, 1% Tween20 pH 2,2. Para realizar el *stripping*, se realizan 2 incubaciones de la membrana con buffer *stripping* durante 20 minutos cada una. Posteriormente, se lava 2 veces con PBS durante 10 minutos y, luego, se realizan 2 lavados con TBS-T 0,01% de 5 minutos cada uno.

11. ENSAYO DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

11.1. Fundamento

El ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) nos permite evaluar interacciones entre proteínas y ARN, que participan en vías de regulación post-transcripcional (Fillebeen et al. 2014). En nuestras experiencias, utilizamos esta técnica para evaluar la capacidad de unión de la proteína citosólica IRP1 al segmento IRE del ARNm.

Este ensayo, consiste en incubar homogenados de proteínas que contiene IRP1 con un exceso de sonda de ARN, que contiene al segmento IRE marcado con biotina. Posteriormente, la mezcla se analiza por electroforesis no desnaturizante en gel de poliacrilamida (Fillebeen et al. 2014). La sonda libre migra rápido, mientras que el complejo ARN-proteína posee un retraso en su movilidad electroforética.

Luego de realizar la transferencia, el revelado se realiza mediante la incubación con estreptavidina marcada con HRP utilizando la capacidad de unión estreptavidina-biotina. La electroquimioluminiscencia se evidencia empleando luminol y peróxido de hidrógeno como sustrato (Fillebeen et al. 2014).

11.2. Protocolo experimental

11.2.1 Preparación de homogenados

Para la obtención de homogenados celulares para EMSA, se elimina el medio de las placas de cultivo y se lavan 2 veces con buffer PBS a 37 °C. Luego, se agrega Tris-EDTA y se

incubaban durante 5 minutos en estufa a 37 °C, para que las células se suelten de la placa. Posteriormente, las células se recolectan cuidadosamente y se centrifugan a 3000 g durante 5 minutos. Luego de eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspende en 20 µl de buffer lisis compuesto por: 0,5% NPHO, Glicerol 5%, HEPES 10Mm, MgCl₂ 3mM, KCl 40mM, PMSF 1 mM, DTT 1mM. Luego, los homogenados se incuban durante 15 minutos en hielo y se centrifuga a 12000 g durante 15 minutos. Posteriormente, se toma el sobrenadante y se freezan a -80°C hasta posterior análisis.

11.2.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas para el estudio de EMSA se realiza mediante el ensayo de proteínas con ácido bicinconínico (BCA) descrito anteriormente.

11.2.3. Gel de Acrilamida

La corrida se realiza en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante (Acrilamida 60x, TBE 5x, Agua DEPC, APS 25% Y TEMED). El gel se pre-corre en buffer TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA) durante 1 hora a voltaje constante de 100 voltios.

11.2.4. Preparación de las muestras

En una primera etapa, se realiza el *super shift* para IRP1. Para ello se incubaba 15 µg de la muestra control con anti-IRP1 (1/10) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, 15 µg de cada muestra y el *super shift* se incuban durante 30 minutos con: 1 µl de glicerol 50%, 1 µl de t RNA 1X, 1 µl de Mg₂Cl 100mM, 1 µl sonda de ARNm marcada con biotina, 1 µl buffer de unión REMSA provistos por el kit. También se prepara un tubo que contiene todos los reactivos menos la muestra, denominado sonda libre. La reacción de unión es frenada por el agregado de 5 µl de buffer muestra provisto por el kit (*Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA Kit*).

11.2.5. Electroforesis

En cada calle del gel pre-corrido, se siembran 20 µl de los 25 µl preparados y se corre a voltaje constante de 100 voltios durante 1 hora 20 minutos en buffer TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA) en agua DEPC.

11.2.6. Transferencia de proteínas

Una vez finalizada la corrida, se realiza la transferencia del ARN-proteína a una membrana de *nylon* modificada provisto por el kit utilizando en buffer TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA) en agua DEPC. Se transfiere durante 30 minutos a una corriente constante de 300 mA en frío.

11.2.7. Crosslinking con radiación ultravioleta

La irradiación de los complejos proteína-ácido nucleico con luz ultravioleta se utiliza para formar enlaces covalentes entre el ácido nucleico y las proteínas que están en estrecho contacto (Chodosh et al., 1986).

Luego de la transferencia, las membranas son expuestas a luz UV a una distancia de 1 cm durante 10 minutos, para realizar el *crosslinking*.

11.2.8. Detección

La detección de la sonda de ARN marcada con biotina, se basa en la afinidad que posee la estreptavidina por la biotina. La membrana se bloquea con el buffer de bloqueo provisto por el kit durante 15 minutos con agitación suave. Luego, se agrega una solución de estreptavidina 1/300 en buffer de bloqueo y se incuba por 15 minutos con agitación suave. Posteriormente, se realizan 4 lavados de 5 minutos cada uno con buffer de lavado diluido 1/5 provisto por el kit y se incuba con buffer de equilibrio durante 5 minutos con agitación suave.

La detección se realiza agregando partes iguales de luminol y de peróxido de hidrógeno, y se incuba durante 2 minutos. Las membranas se exponen a films durante 3, 5 y 10 minutos. Los films se escanean (HP Scanjet G3110) y se procesan con el software ImageJ (Image J 1,47h, Wayne Rasband National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

12. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS

12.1. Fundamento

La técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utiliza las reacciones antígeno-anticuerpo para la cuantificación de un determinado antígeno. El ensayo de ELISA

de tipo *sándwich* es una técnica de inmunoensayo en la cual un anticuerpo inmovilizado se une al antígeno de la muestra (Voller et al., 1978). Dicho antígeno, es posteriormente reconocido por un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como por ejemplo un producto coloreado (Voller et al., 1978). La aparición de color permite medir indirectamente la cantidad de antígeno en la muestra. En nuestro caso, utilizamos esta técnica para cuantificar los niveles de ferritina.

12.2. Procedimiento experimental

En una primera etapa, se recubre los pocillos de una Placa de ELISA con 150 µl por pocillo de anticuerpo anti-ferritina diluido 1/10000 (*Rockland*) y se incuba toda la noche a 4°C sin movimiento. Luego de realizar 3 lavados con buffer PBS 1% BSA-Tween 0,05%, se incuba durante 30 minutos con buffer PBS-Tween 0,05% con 10% de leche descremada, para bloquear uniones inespecíficas. Posteriormente, se realizan 3 lavados con buffer PBS 1% BSA-Tween 0,05%, y se agrega 100 µl de soluciones con concentraciones crecientes de ferritina humana para realizar la curva de calibrado (0, 0.1, 0.4, 0.8 y 1.2 ng de ferritina) o 100 µl de la muestra que contiene 10 µg de proteína llevando a volumen con PBS 1% BSA-Tween 0,05%. Luego de incubar 2 horas a temperatura ambiente, se realizan 3 lavados con PBS 1% BSA-Tween 0,05% y se agrega el anticuerpo anti-ferritina marcado con peroxidasa (*Rockland*) diluido 1/10000 con PBS 1% BSA-Tween 0,05% incubando durante 2 horas a temperatura ambiente.

Finalmente, se realizan 3 lavados y se agrega el sustrato de la peroxidasa incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción se detiene con el agregado de H₂SO₄ 25%. El color amarillo desarrollado se mide espectrofotométricamente a 495 nm.

13. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

13.1. Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos desarrollada por Kary Mullis en 1987. En nuestras experiencias, utilizamos la PCR acoplada a la enzima

transcriptasa reversa que convierte el ARNm (ácido ribonucleico mensajero) en ADN complementario (ADNc) (Tamay de Dios et al., 2013). Posteriormente, se utiliza dicho ADNc como molde para amplificar el segmento de interés utilizando primers específicos, desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), magnesio (Mg^{2+}), buffer y H_2O .

La amplificación se realiza en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. Estas etapas se realizan en termocicladores, equipos diseñados para que las condiciones de temperatura y tiempo no se modifiquen en cada uno de los ciclos repetidos (Tamay de Dios et al., 2013). Finalmente, los productos de la PCR o amplicones separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante tinción con colorantes fluorescentes, lo que permite evaluar su integridad y estimar su concentración mediante un análisis comparativo con ARNm de proteínas cuya expresión no varía en las condiciones estudiadas. En nuestro caso, empleamos bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del ADN y emite fluorescencia cuando se ilumina con luz ultravioleta.

13.2. Procedimiento experimental

13.2.1. Método de extracción

Para la extracción del ARN de las células se utiliza el reactivo Trizol que disrumpe los componentes celulares y extrae el ARN. Este reactivo, mantiene la integridad del ARN y ADN, protegiendo la muestra de la posible contaminación con ARNasas, debido a que desnaturaliza las nucleasas internas. El reactivo Trizol es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Puissant & Houdebine, 1990). Luego de lavar las placas con PBS, se agrega 1 mL del reactivo Trizol (*INVITROGEN*[®]) a cada placa, siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante. Posteriormente, mediante la utilización de un *scraper*, se lisan las células y se recolectan para realizar la extracción de ARN. Para extraer el ARN se agregan 200 μ L de cloroformo a cada muestra, agitando vigorosamente e incubando 3 minutos a T° ambiente. Luego de centrifugar a 12.000 g durante 15 minutos a $4^\circ C$, se remueve la capa acuosa (fase superior) que es la que contiene el ARN. La precipitación del ARN se realiza agregando 500 μ L de isopropanol y luego de incubar 10 minutos, se centrifuga a 12.000 g durante 10 minutos a $4^\circ C$. Finalmente, se descarta el sobrenadante y

se lava el pellet con 1 mL de etanol 75% y se centrifuga a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Luego se agrega agua libre de ADNAsas y ARNAsas para disolver precipitado.

13.2.2. Obtención de ADN complementario

El ARN obtenido se transforma en ADNc por acción de la enzima transcriptasa reversa. Este paso permite la obtención del ADNc de una sola hebra que posteriormente se utiliza en la Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a Transcriptasa Reversa (*RT-PCR*).

Para obtener del ADNc se utiliza la enzima transcriptasa reversa de un kit comercial (*RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit*), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se preparan 12 µl de mezcla de reacción usando: muestra + agua DEPC (10 µl), dNTP 1 µl y Oligodt 1 µl, y se introducen en el termociclador. Durante la incubación a 4°C, se agrega 7 µl de la siguiente mezcla de reacción por muestra: buffer 5x 4 µl, DTT 2 µl y enzima Ribolock 1 µl. Finalmente, antes de comenzar la incubación a 37°C durante 50 minutos, se agrega la enzima transcriptasa reversa 1 µl.

Las muestras se incuban según el siguiente programa: 5 minutos a 65°C; 1 minutos a 4°C, 2 minutos a 37°C, 50 minutos a 37°C, 10 minutos a 70°C y durante tiempo ∞ a 4°C.

13.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa

La reacción en cadena de la polimerasa se realiza sobre las muestras de ADNc monohebra obtenido previamente. Se utilizó el kit comercial *SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase*.

Se utilizaron *primers* específicos para la amplificación de: DMT1, IRP1 y Actina.

<i>ARNm a amplificar</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
DMT1 IRE	5'-TGTTTGATTGCATTGGGTCTG-3'	5'-CGCTCAGCAGGACTTTCGAG-3'
DMT1 no IRE	5'-TCCTGGACTGTGGACGCTC-3'	5'-GGTGTTCCAGAAGATAGAGTTCAGG-3'
IRP1	5'-CAGCCACCCAAGTCCAATAGT-3'	5'-GCGTCGAATACATCAAGGGT-3'
ACTINA	5'-TACAGCTTCACC ACCACAGC-3'	5'-AAGGAAGGCTG GAAAAGAGC-3'

Tabla 4. Lista de *primers* utilizados

Para la amplificación se utilizaron los siguientes programas:

ARNm a amplificar	Desnaturalización	Hibridización	Elongación
DMT1 IRE/ DMT1 no IRE	94°C durante 3 min	28 ciclos de 1 minutos a 95°C, 90 segundos a 53°C y 4 minutos a 68°C	72°C durante 1 min
IRP1	94°C durante 3 min	28 ciclos de 1 minutos a 95°C, 90 segundos a 53°C y 4 minutos a 68°C	72°C durante 1 min
Actina	94°C durante 3 min	26 ciclos de 1 minutos a 95°C, 90 segundos a 53°C y 4 minutos a 68°C	72°C durante 1 min

Tabla 5. Programas de amplificación

13.2.4. Separación y detección de los fragmentos amplificados

Luego de la amplificación, se mezclan 8 µl de la muestra amplificada y 2 µl de buffer muestra. Posteriormente, la muestra se siembra y se corre en un gel de agarosa 1,5 % conteniendo 2,5% de Bromuro de Etidio durante 45 minutos.

Finalmente, el gel que contiene los amplicones de ARNm separados por tamaño, se observa bajo luz UV y se toma una foto con Cámara Digital Fujifilm S8650. Luego, la imagen se procesa con el software ImageJ (Image J 1,47h, Wayne Rasband National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) para semicuantificar las bandas obtenidas.

14. BIOESTADÍSTICA

14.1. Diseño Experimental Pareado

La elección del diseño experimental a utilizar depende de los objetivos del estudio. El protocolo experimental a seguir y los métodos estadísticos a utilizar deben ser estrictamente detallados antes de comenzar el trabajo (Festing y Altman, 2002).

Un experimento bien diseñado evita el sesgo y es lo suficientemente potente como para ser capaz de detectar los efectos de los tratamientos que puedan ser de importancia biológica (Festing & Altman, 2002).

En nuestro caso, utilizamos el diseño experimental pareado, en el cual los animales se agrupan de acuerdo a una variable elegida. Este diseño, permiten dividir un experimento en un determinado número de "mini-experimentos", aumentando así el grado de precisión y/o disminuyendo la variabilidad debida a estructuras naturales en el material experimental (Festing & Altman, 2002).

El diseño pareado, es empleado cuando se desea evaluar la respuesta a dos tratamientos diferentes, en donde el control es considerado como un tratamiento. Los animales se agrupan de a pares (control-experimental), teniendo en cuenta una variable que incorpore heterogeneidad al experimento, como el peso, sexo, edad. En nuestro caso, se forman pares de ratones utilizando el peso corporal como variable elegida para la homogenización de los animales. Posteriormente, se le asigna, al azar, un tratamiento a cada ratón del par formado (Festing, 2006).

Los pares de ratones se tratan al mismo tiempo y se alojan en una misma jaula, lo que nos permiten asegurar que el par se encuentra expuesto a exactamente las mismas condiciones ambientales, reduciendo al mínimo las diferencias en los parámetros ambientales a los que están expuesto los ratones.

14.2. Determinación del tamaño de muestra

Decidir el tamaño de muestra es de fundamental importancia debido a las implicancias éticas de la utilización de animales en la investigación (Festing & Altman, 2002). Un experimento demasiado pequeño puede generar resultados estadísticamente inválidos, mientras que un experimento con un gran número de ratones no sigue las normas éticas del uso de animales de laboratorio (Festing & Altman, 2002).

Existen diversos métodos para determinar el tamaño de muestra. En nuestro caso, para establecer el número de animales en cada experimento utilizamos el método de la ecuación recursiva (Festing, 2006). Una de las ventajas de este método, es que se puede prescindir de la determinación de la desviación estándar o del efecto de interés biológico.

En este método, el número de grados de libertad asociados con el error residual de un experimento (E) debe estar entre 10 y 20.

Materiales y Métodos

Para determinar el tamaño de muestras se emplea la siguiente fórmula: $E = N - T$

$N = n^{\circ}$ de grados de libertad del n° total de ratones (n° total de ratones -1)

$T = n^{\circ}$ de grados de libertad de los tratamientos (n° de tratamientos -1)

Mediante esta fórmula se calcula el N necesario para que el error residual del experimento (E) se encuentre entre 10 y 20, conociendo los grados de libertad de los tratamientos (T).

En nuestros experimentos el número total de ratones empleados fue de 12 y el número de tratamientos fueron 2 para cada modelo experimental. Por lo tanto: $E = 11 - 1$, resultando $E = 10$.

Concluimos que utilizando 12 ratones en cada modelo experimental (6 ratones por grupo), el error residual del experimento se encuentra entre 10 y 20. Por lo tanto, 12 es el mínimo número de ratones a utilizar para obtener resultados con relevancia estadística.

14.3. Análisis Estadístico

14.3.1. Test *t-student* para muestras pareadas

El análisis *t-student* se utiliza para analizar diferencias entre dos tratamientos de muestras que pueden ser pareadas o no pareadas. El estudio *t-student* para muestras pareadas se utiliza para el análisis estadístico de resultados obtenidos a través del empleo de un diseño pareado.

Para el análisis se determinan las diferencias entre los tratamientos y se calcula la varianza de las diferencias siguiendo la siguiente fórmula:

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

Siendo: d : media de las diferencias; n : número de pares

Luego se calcula el estadístico t

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

Posteriormente se compara el t calculado con un t de tabla, trabajando con n-1 grados de libertad. Si el t de la muestra es mayor que el t tabla, significa que existen diferencias significativas entre las medias de las dos poblaciones. En todos los casos estudiados el nivel de significancia se fijó en $p < 0,05$. Para las diferencias altamente significativas se fijó un $p < 0,01$.

14.3.2. Análisis de Varianza

Para el análisis de más de dos tratamientos se utiliza el análisis de la varianza (ANOVA). Mediante este análisis se calcula el *estadístico F* y se compara con el *estadístico F tabla*, teniendo en cuenta los grados de libertad de los tratamientos en el numerador y los grados de libertad del error residual en el denominador. Si el F calculado es mayor que el F tabla significa que existen diferencias significativas entre las medias de las poblaciones. En todos los casos estudiados el nivel de significancia se fijó en $p < 0,05$. Para las diferencias altamente significativas se fijó un $p < 0,01$ (Graph Pad Prism versión 5.01, © 1992-2007. Graph Pad Software, Inc.).

14.3.3. Comparaciones múltiples

Cuando el valor calculado del estadístico F en un ANOVA es significativo, es necesario saber cuáles de las medias son diferentes entre sí. El método utilizado en nuestros estudios para completar el análisis es el *procedimiento de comparaciones múltiples de Tukey modificado* (Devore, 2001). En este procedimiento se determina en primer lugar la mínima diferencia significativa o "*allowance*", llamado D.

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

Materiales y Métodos

Siendo: **Q**: estadístico de amplitud total estudentizada, obtenido de tabla, según los grados de libertad del error residual de ANOVA, n° de tratamientos (K) y el α utilizado; **n**: número de réplicas por tratamiento; **CMres**: cuadrado medio residual de la tabla de ANOVA.

Posteriormente se comparan todas las medias calculando las diferencias entre ellas. Por último, se analizan las diferencias calculadas y cuando la diferencia es mayor que el D calculado, significa que existen diferencias entre las medias involucradas (Graph Pad Prism versión 5.01, © 1992-2007. Graph Pad Software, Inc.).

RESULTADOS

Capítulo 1

Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro.
Evaluación de la eritropoyesis
y de la ferremia

1.1. MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO

El desarrollo de un Modelo Animal es una herramienta biológica para estudios *in vivo* de la fisiología en mamíferos, que nos permiten inducir condiciones patológicas análogas a las descritas en las enfermedades humanas.

Mediante el Modelo de Sobrecarga de Hierro pudimos evaluar el balance y desbalance del hierro en órganos clásicamente relacionados con el ciclo del biometal. Un aspecto innovador del presente trabajo de tesis fue el estudio del hierro en órganos como páncreas, riñón y pulmón.

1.1.1. Diseño experimental

Como se ha descrito en la sección Materiales y Métodos, ratones hembra cepa CF1 se dividieron en dos grupos: **1)** Sobrecarga de hierro (n=6), administración intraperitoneal (i.p.) de hierro-Sacarato los días 0, 5, 10 y 15 (dosis total 1,3 g/kg de peso corporal); **2)** Adecuado hierro (grupo control) (n=6): administración i.p. de solución fisiológica los días 0, 5, 10 y 15 (Figura 9). Se utilizó el diseño experimental pareado, donde la variable “peso corporal” se seleccionó para formar pares de los dos tratamientos (ratón con adecuado hierro-ratón con sobrecarga de hierro). Para el análisis estadístico de los resultados fue elegido el *test t-student*.

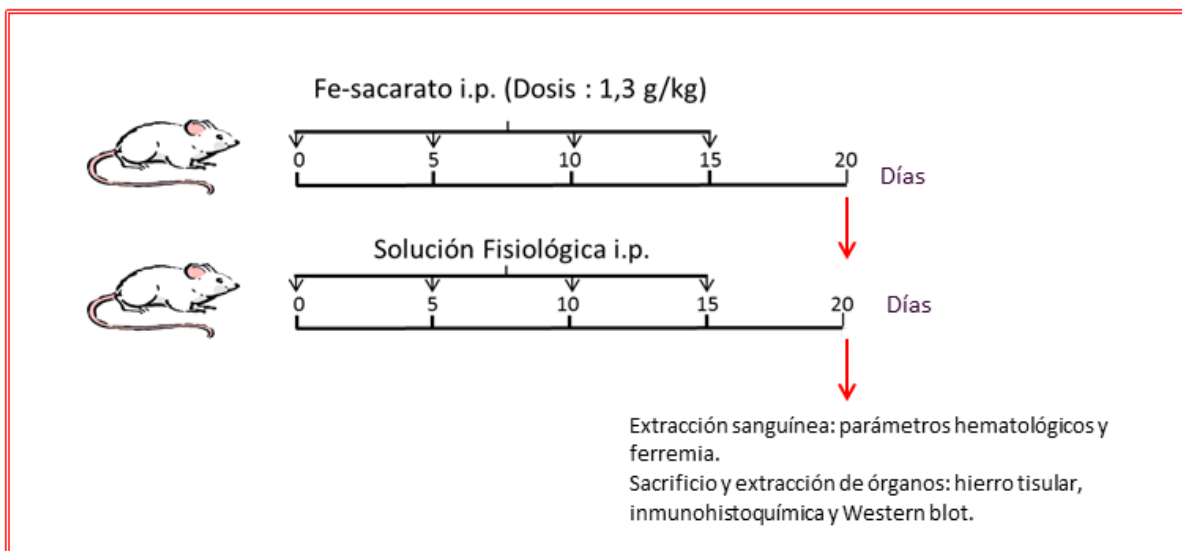


Figura 9. Esquema del diseño experimental del Modelo de Sobrecarga de Hierro

1.1.2. Resultados

1.1.2.1. Estudios hematológicos

Se muestran los valores de hemoglobina (Hb) y de hematocrito (HTO) en ratones (n=6/grupo) con sobrecarga de hierro (Hb: $14,1 \pm 0,6$ g/dL; HTO: $44 \pm 1\%$) y adecuado hierro (Hb: $15,6 \pm 0,2$ g/dL; HTO: $49 \pm 1\%$) (Figuras 10A y B). Los parámetros hematológicos no mostraron variaciones significativas en exceso de hierro respecto al grupo control (adecuado hierro).

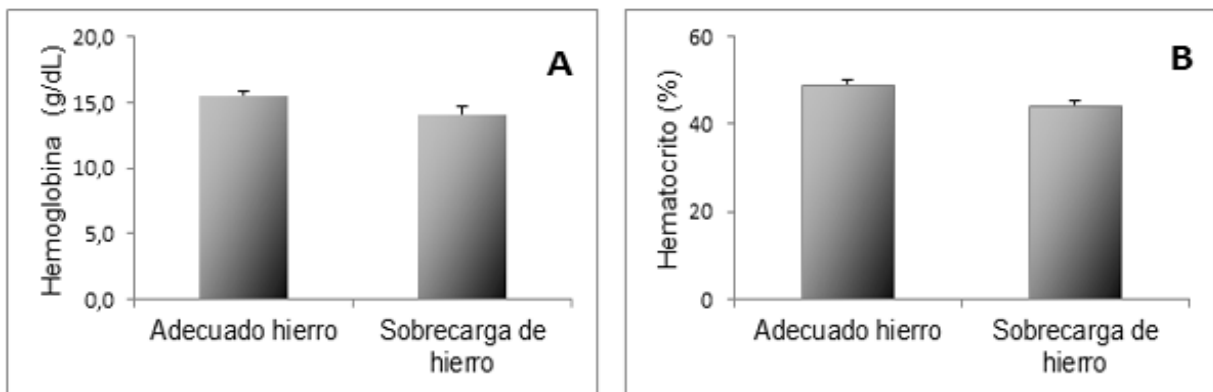


Figura 10. Hemoglobina y hematocrito en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. Ratones con sobrecarga de hierro inducida por la administración de Hierro-Sacarato los días 0, 5, 10 y 15 del protocolo experimental (dosis total= 1,3 g/Kg peso); a ratones con adecuado hierro (control) se les administró solución fisiológica. Las muestras sanguíneas se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos (n=6/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar.

1.1.2.2. Estudio del hierro plasmático

El hierro plasmático reveló un aumento significativo en sobrecarga de hierro (477 ± 108 μ g/dL), comparado con los valores observados en adecuado hierro (264 ± 49 μ g/dL) (Figura 11).

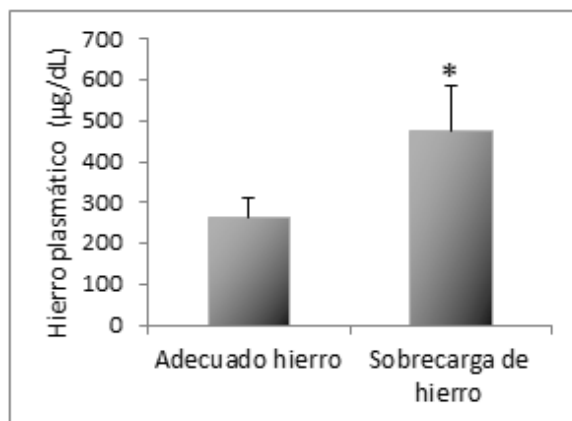


Figura 11. Hierro plasmático en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. Las muestras plasmáticas se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos (n=6/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; * $p < 0.05$, sobrecarga de hierro vs. adecuado hierro.

1.2. MODELO DE DEFICIENCIA DE HIERRO

En estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio se ha avanzado en el conocimiento del metabolismo del hierro en estados de alta demanda de hierro, mediante el desarrollo de modelos animales de anemia hemolítica y de hipoxia (D'Anna et al., 2009; D'Anna & Roque, 2013).

En el presente trabajo de tesis, el desarrollo del Modelo Animal de Deficiencia de Hierro inducida por flebotomía fue necesario para profundizar nuestros estudios sobre la regulación de las proteínas que movilizan el hierro celular en estados de alta demanda de hierro.

1.2.1. Diseño experimental

Como se ha descrito en la sección Materiales y Métodos, ratones hembra cepa CF1 se dividieron en dos grupos: **1)** Deficiencia de hierro (n=6), extracciones sanguíneas seriadas del seno retro-orbital cada 5 días durante 25 días bajo anestesia con isoflurano; **2)** Control (n=6): anestesiados con isoflurano sin extracción sanguínea cada 5 días durante 25 días, operación simulada (Figura 12). Se utilizó el diseño experimental pareado, donde la variable "peso corporal" se seleccionó para la formación de pares de los dos tratamientos (ratón control-ratón con deficiencia de hierro). Para el análisis estadístico de los resultados fue elegido el *test t-student*.

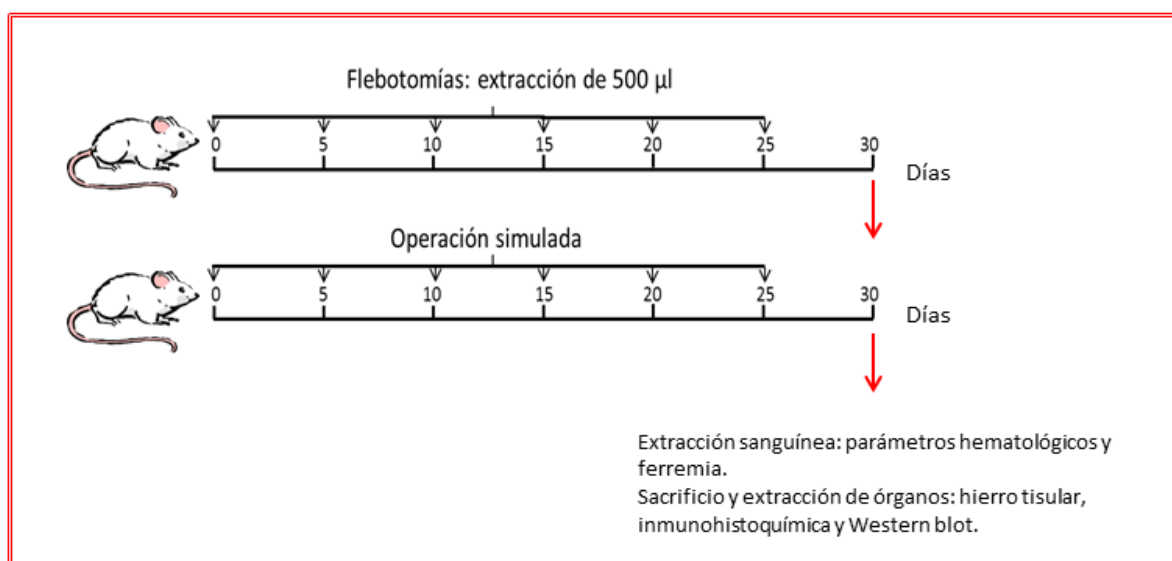


Figura 12. Esquema del diseño experimental del Modelo de Deficiencia de Hierro

1.2.2. Resultados

1.2.2.1. Estudios hematológicos

El estado de anemia se evidenció por la disminución significativa de los niveles de hemoglobina en deficiencia de hierro ($10,3 \pm 0,3$ g/dL), respecto al control ($15,2 \pm 0,5$ g/dl) (Figura 13A). Los valores de hemoglobina se relacionan en deficiencia de hierro con la disminución del hematocrito (39 ± 2 %) respecto al control (49 ± 2 %) (Figura 13B). El recuento de reticulocitos mostró un aumento estadísticamente significativo en los ratones con deficiencia de hierro ($28 \pm 1\%$), comparado con la condición control ($2 \pm 1\%$) (Figura 13C).

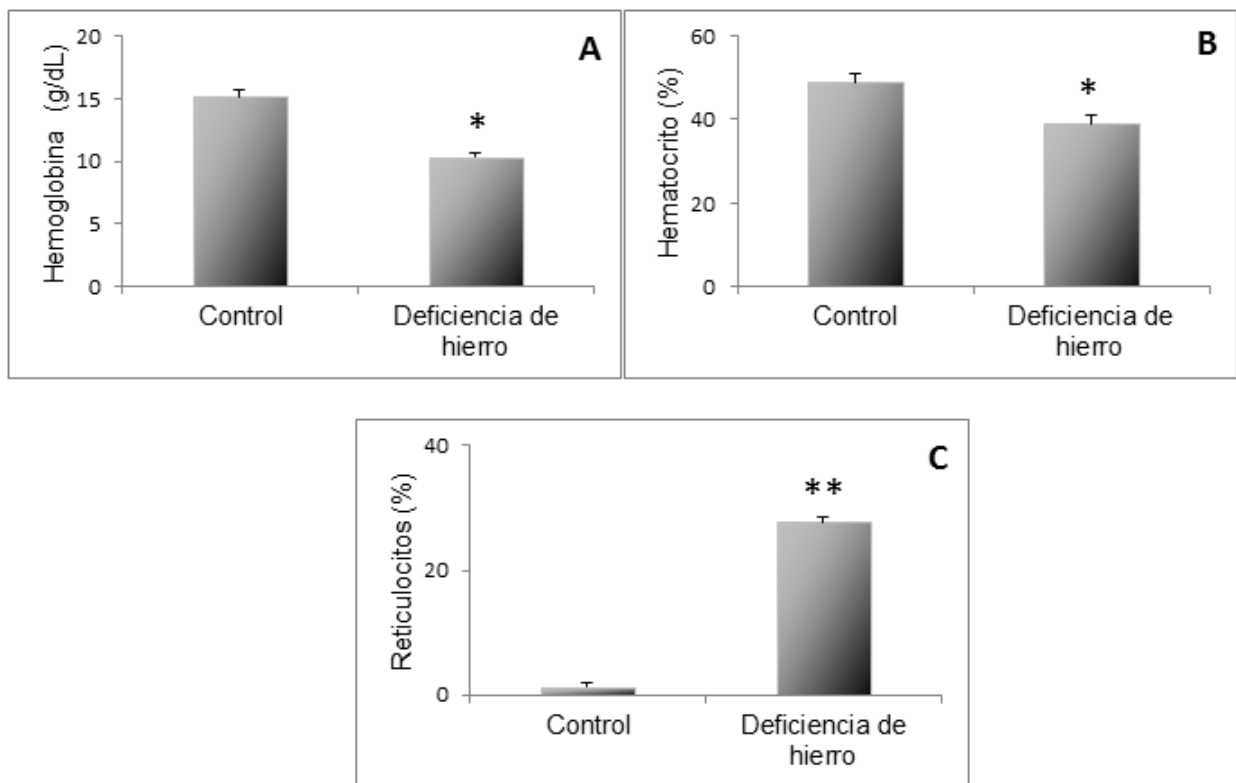


Figura 13. Hemoglobina, hematocrito y reticulocitos en el Modelo de Deficiencia de Hierro. Ratones con deficiencia de hierro inducida por extracción de 500 μ l de sangre cada 5 días durante 25 días; a ratones control se les realizó una operación simulada sin extracción sanguínea. Las muestras sanguíneas se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos (n=6/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ deficiencia de hierro vs. control.

1.2.2.2. Estudio del hierro plasmático

Identificamos un aumento estadísticamente significativo de la ferremia en deficiencia de hierro ($213 \pm 21 \mu\text{g/dL}$), respecto al control ($177 \pm 4 \mu\text{g/dL}$) (Figura 14).

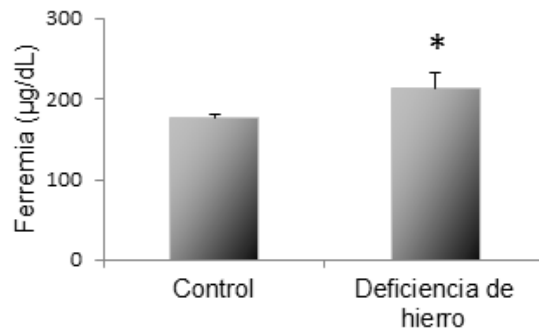


Figura 14. Hierro plasmático en el Modelo de Deficiencia de hierro. Las muestras plasmáticas se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=6/\text{grupo}$). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; * $p < 0.05$, deficiencia de hierro vs. control.

Capítulo 2

**Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro.
Caracterización de las proteínas del hierro
y su regulación en hígado y duodeno**

2.1. INTRODUCCIÓN

La biodisponibilidad del hierro es estrictamente controlada por un sistema regulatorio complejo que involucra la comunicación entre múltiples órganos como duodeno, hígado y bazo (Ganz & Nemeth, 2006). Dilucidar la coordinación funcional entre estos órganos es un aspecto central para el estudio de enfermedades asociadas a alteraciones del ciclo del hierro que presentan abundantes reservas tisulares de hierro por la disminución de la síntesis del regulador hepcidina (Ganz, 2011).

Por otro lado, el desbalance del hierro que cursa con disminución de los niveles de este biometal produce la disminución de la síntesis de hemoglobina y generalmente conduciría a la anemia ferropénica (Lopez et al., 2015). La regulación de las proteínas que movilizan el hierro en los sitios de absorción y de reserva en deficiencia de hierro es esencial para aumentar la biodisponibilidad del hierro requerido para la eritropoyesis activa.

Nos propusimos estudiar los mecanismos que regulan la movilización del hierro en hígado y en duodeno en nuestros Modelos Animales de Sobrecarga de Hierro y de Deficiencia de Hierro.

2.2. DESCRIPCIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL DUODENO, HÍGADO Y BAZO

El estudio del duodeno fue abordado enfocando su bien caracterizada función absorbente del hierro hemo y no hemo (Pérez et al., 2005).

En la arquitectura duodenal, la relación entre estructura y función revela una superficie absorbente 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 que se compone principalmente de 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, sacos estrechos que se abren a la luz intestinal a través de poros. La base de una 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 (Figura 15).

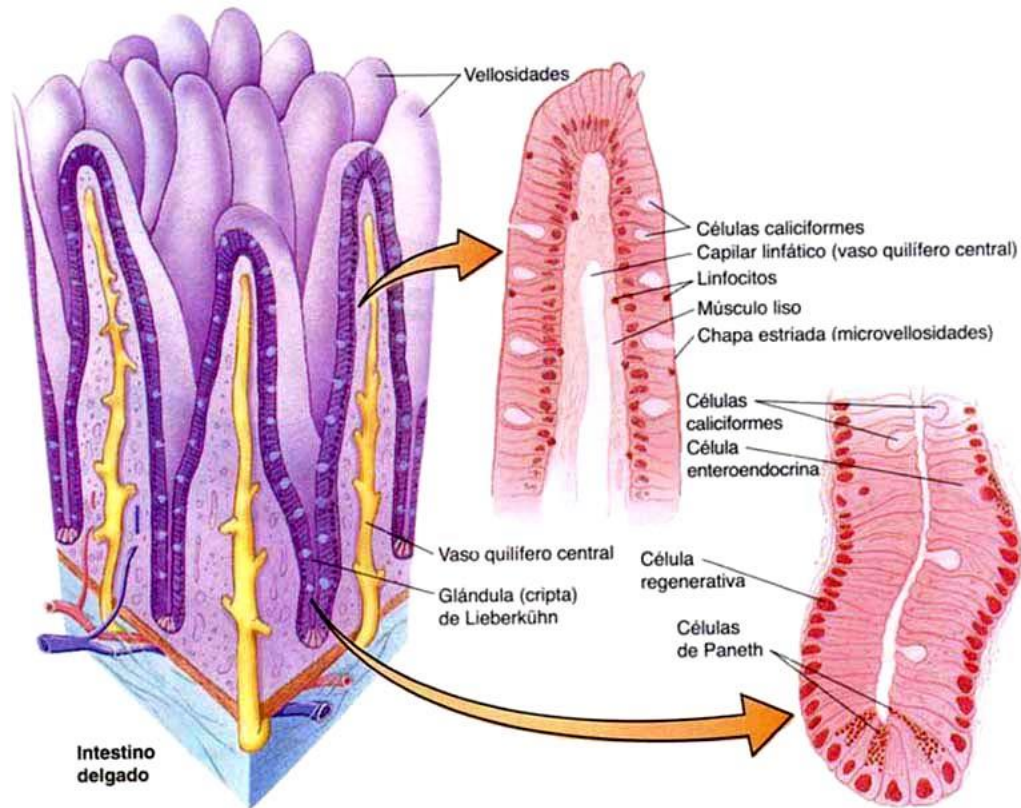


Figura 15. Diagrama esquemático del duodeno.
Gartner y Hiatt. Atlas Color Histología. 4° edición (1998)

El hígado es un órgano de depósito de hierro por excelencia, que se sitúa en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, debajo del diafragma y por encima del estómago, del riñón derecho y de los intestinos. El hígado cumple funciones en el metabolismo de lípidos y de carbohidratos, en la síntesis de proteínas y en la secreción de bilis. La multiplicidad funcional de este órgano se basa en sus características estructurales y en el aporte de la sangre desde la circulación sistémica y desde la vena porta. Los lóbulos hepáticos están formados por unidades más pequeñas llamadas lobulillos, que son la unidad funcional del hígado. 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 (Figura 16).

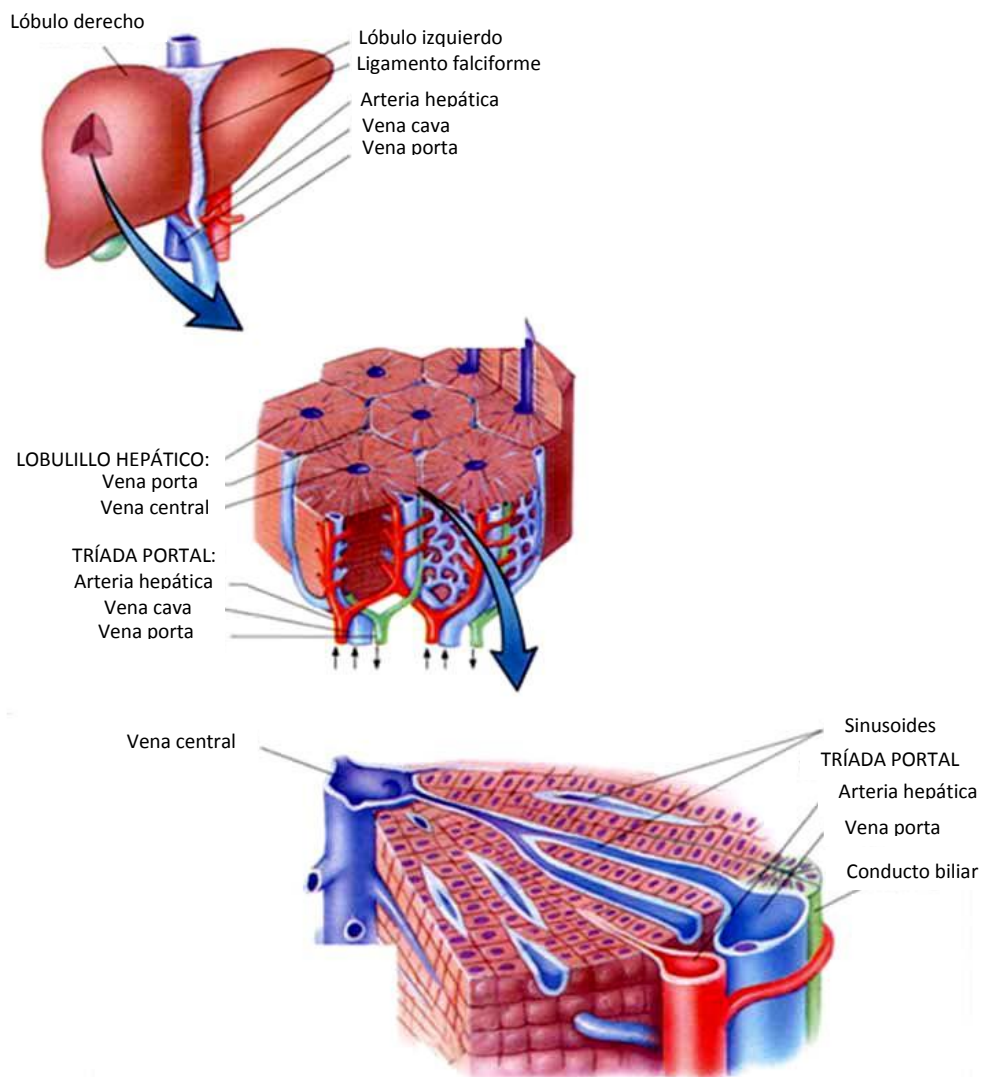


Figura 16. Diagrama esquemático del hígado.
Gartner y Hiatt. Atlas Color Histología. 4° edición (1998)

El bazo es un órgano linfático que se sitúa en el cuadrante superior izquierdo de la cavidad abdominal. Este órgano presenta diversas funciones, dentro de las cuales se destacan la linfopoyesis (formación de glóbulos blancos) y la eritrofagocitosis (fagocitosis de glóbulos rojos). Además, el bazo se caracteriza por ser un órgano de reserva de hierro debido a su participación en la destrucción de eritrocitos alterados o senescentes.

En el tejido esplénico se destacan la pulpa blanca y roja, regiones separadas por la zona marginal, donde se observan linfocitos y macrófagos. 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 amplia celularidad observándose eritrocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, megacariocitos y granulocitos (Figura 17).

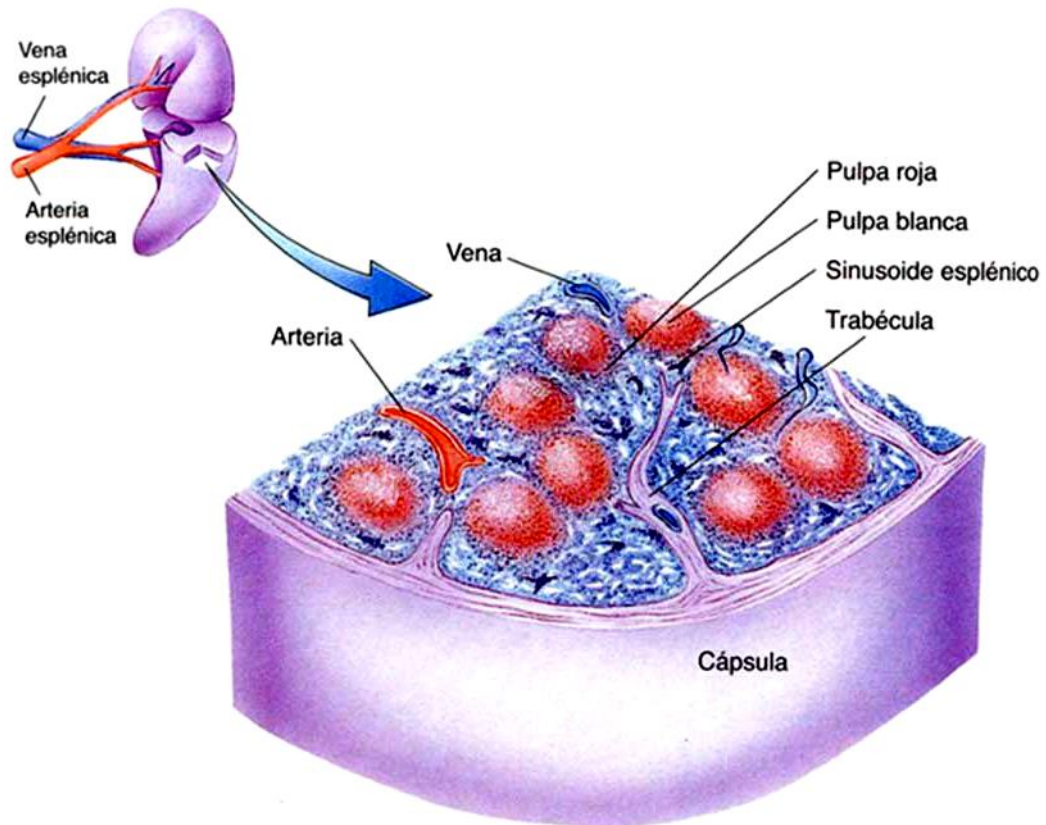


Figura 17. Diagrama esquemático del bazo.
Gartner y Hiatt. Atlas Color Histología. 4° edición (1998)

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Modelo de Sobrecarga de Hierro

2.3.1.1. Estado del hierro hepático y esplénico

2.3.1.1.1. Estudio cuantitativo del hierro

Tanto en el hígado como en el bazo se observó un aumento significativo del hierro tisular en sobrecarga respecto al control ($32,32 \pm 12,21 \mu\text{mol/gr tej.}$ vs. $1,18 \pm 0,35 \mu\text{mol/gr tej.}$) y ($195,17 \pm 12,21 \mu\text{mol/gr tej.}$ vs. $5,05 \pm 32,54 \mu\text{mol/gr tej.}$), respectivamente (Figuras 18A y B).

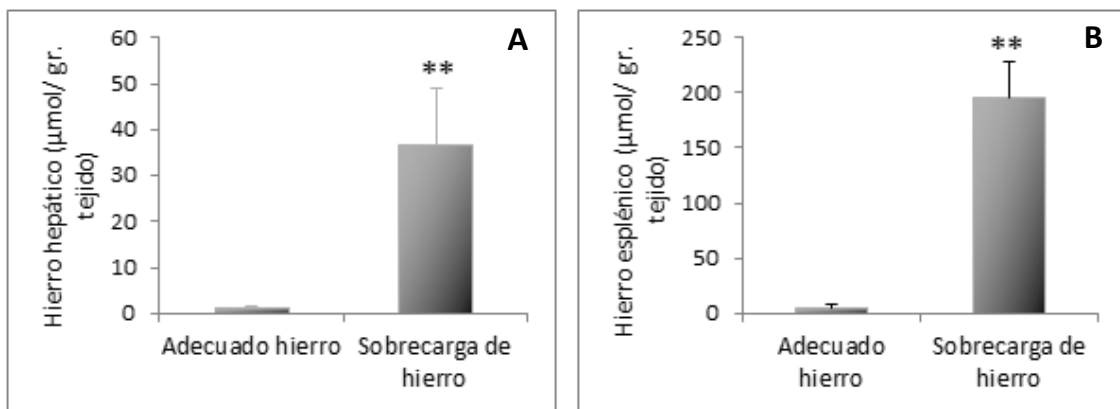


Figura 18. Hierro hepático y esplénico en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) Hierro hepático; **B)** Hierro esplénico. Las muestras tisulares se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos (n=6/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; ** p < 0.01 sobrecarga de hierro vs. adecuado hierro.

2.3.1.1.2. Estudio cualitativo del hierro

En el Modelo de Sobrecarga de Hierro se observó en el bazo abundante depósito de hemosiderina en la pulpa roja, siendo escasa en adecuado hierro (control) (Figuras 19A-D). En exceso de hierro, en el hígado se detectó abundante hemosiderina en células con morfología similar a células de Kupffer y escasa en los hepatocitos (Figura 20B). Sin embargo, en adecuado hierro no se observó presencia de hemosiderina en ambos tipos celulares (Figura 20A).

Resultados

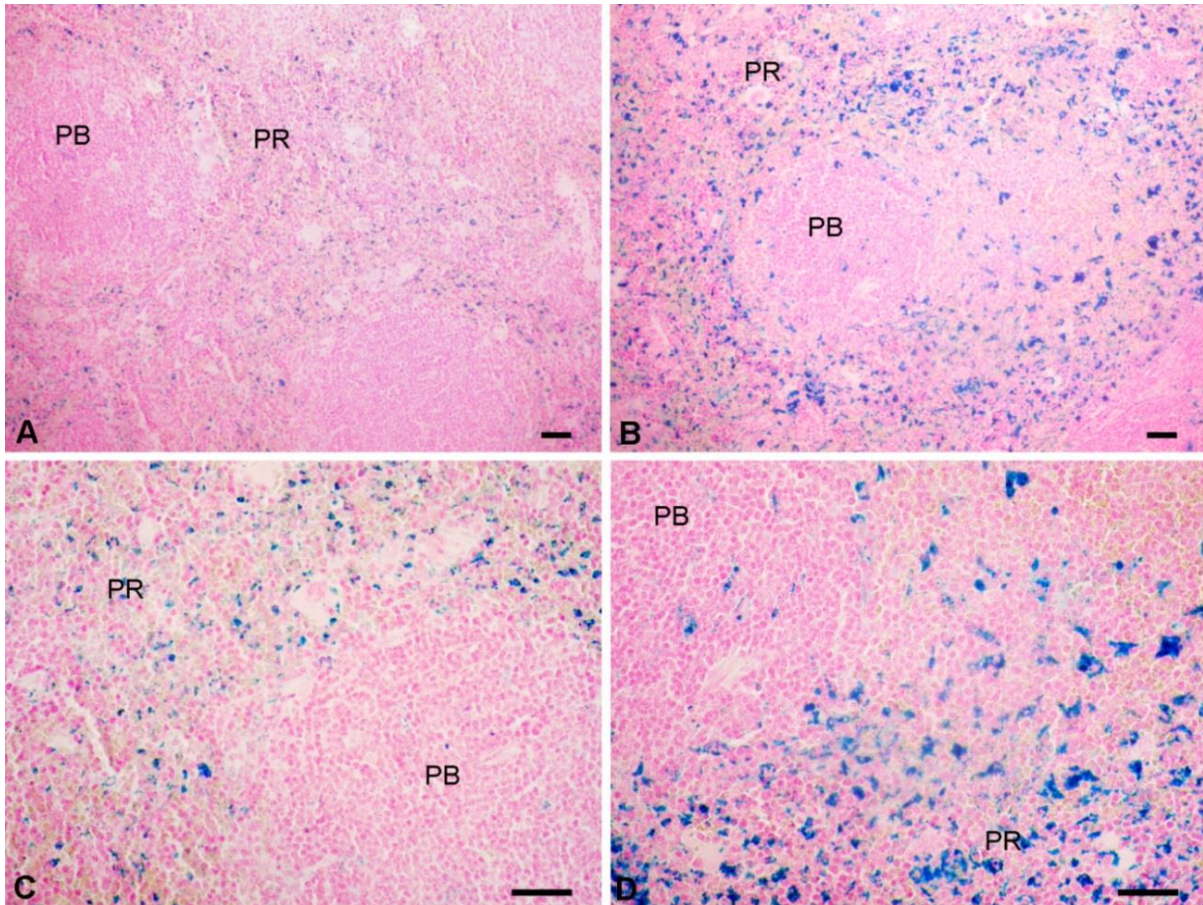


Figura 19. Hemosiderina en bazo en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. **A)** Hemosiderina en células de la pulpa roja del bazo de ratón con adecuado hierro (marcación azul); **B)** Hemosiderina en células de la pulpa roja del bazo de ratón con sobrecarga de hierro (marcación azul); **C)** Hemosiderina en células de la pulpa roja del bazo de ratón con adecuado hierro (marcación azul); **D)** Hemosiderina en células de la pulpa roja del bazo de ratón con sobrecarga hierro (marcación azul). Los tejidos se procesaron para la tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). PB: pulpa blanca: PB pulpa roja. La barra representa 20 μm .

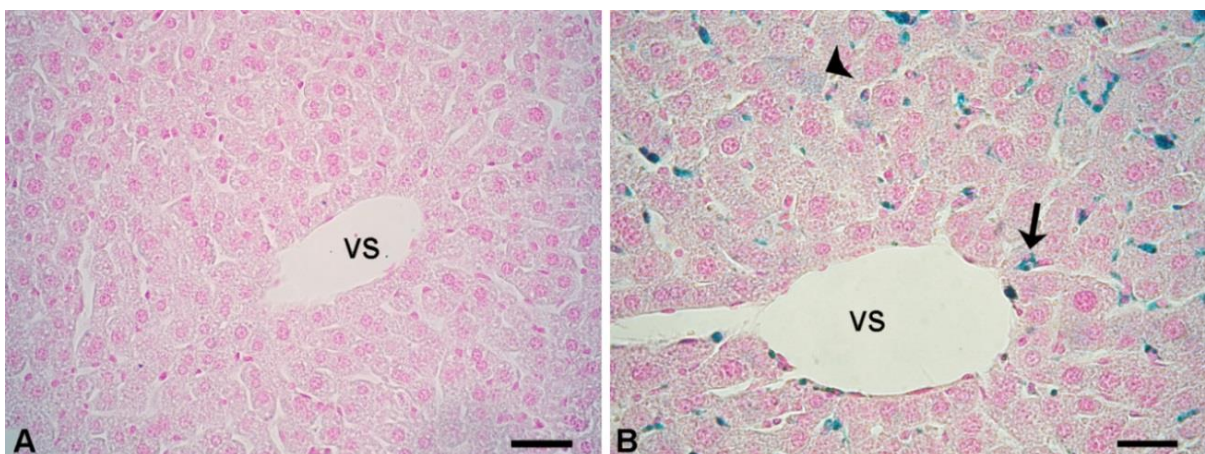


Figura 20. Hemosiderina en hígado en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. **A)** Ausencia de hemosiderina en hígado de ratón con adecuado hierro; **B)** Hemosiderina en células de Kupffer (flecha) y en hepatocitos (punta de flecha) de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para la tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). VS: vaso sanguíneo. La barra representa 20 μm .

2.3.1.2. Transportador de metales divalentes 1 hepático y duodenal

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 transportador de metales divalentes 1 (DMT1) capta el hierro libre de la dieta en el duodeno e importa el hierro unido y no unido a la Tf del plasma en el hígado (Andrews, 1999; Graham et al., 2007). A partir de la función de DMT1 en el transporte celular de hierro, se propuso como objetivo estudiar su expresión y localización en hígado y en duodeno en el Modelo de Sobrecarga de Hierro.

2.3.1.2.1. Duodeno

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 (Figuras 21A y B). En los controles negativos no se detectó inmunoreactividad (Figuras 22A y B).

Por ensayos de *Western blot* se determinó que el nivel de DMT1 duodenal fue significativamente menor en sobrecarga de hierro respecto al estado de adecuado hierro, confirmando que en sobrecarga el cambio de la localización de DMT1 está asociado a los cambios en el contenido proteico (Figura 23).

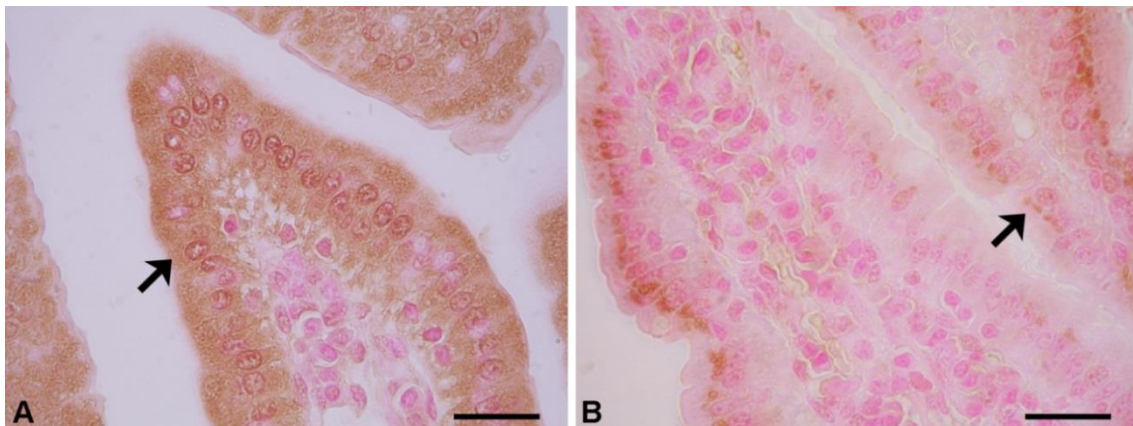


Figura 21. Inmunolocalización de DMT1 en duodeno en el Modelo de Sobrecarga de hierro. A) DMT1 en enterocitos de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** DMT1 en enterocitos de ratón con sobrecarga de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

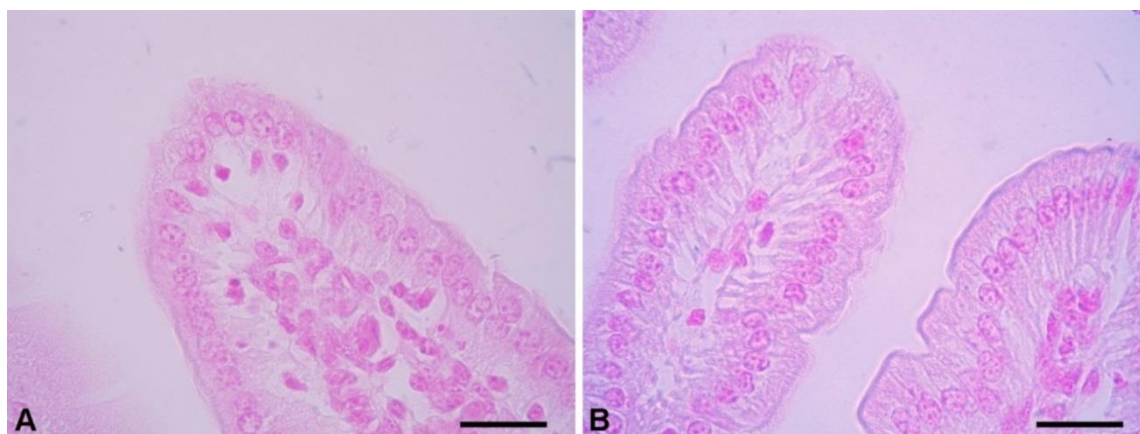


Figura 22. Control negativo del tejido duodenal en el Modelo de Sobrecarga de hierro. **A)** Tejido duodenal de ratón con adecuado hierro incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario; **B)** Tejido duodenal de ratón con sobrecarga de hierro incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 µm.

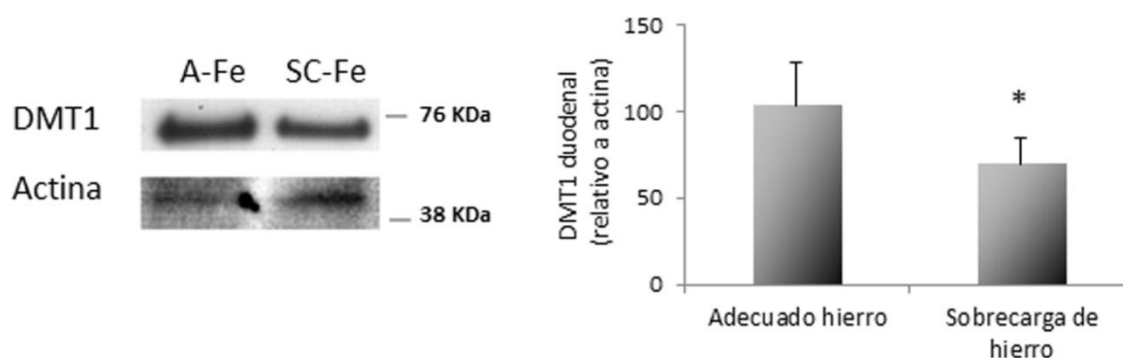


Figura 23. Western Blot de DMT1 duodenal en el Modelo de Sobrecarga de hierro. **AFe:** DMT1 en duodeno de ratón con adecuado hierro; **SCFe:** DMT1 en duodeno de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; * $p < 0.05$ sobrecarga de hierro vs. adecuado hierro.

2.3.1.2.2. Hígado

En adecuado hierro (control) se observó una débil inmunomarcación de DMT1 en el citoplasma de hepatocitos asociados mayoritariamente a vasos sanguíneos (Figura 24A). La localización de DMT1 en los hepatocitos asociados principalmente a vasos sanguíneos se relacionaría con la mayor disponibilidad de hierro para estas células. En exceso de hierro se detectó intensa inmunomarcación citoplasmática de DMT1 en hepatocitos asociados y no asociados a vasos sanguíneos (Figura 24B). Las células de Kupffer fueron inmunonegativas para DMT1 en sobrecarga y en adecuado hierro (Figuras 24A y B). En los controles negativos no se detectó inmunoreactividad (Figuras 25A y B).

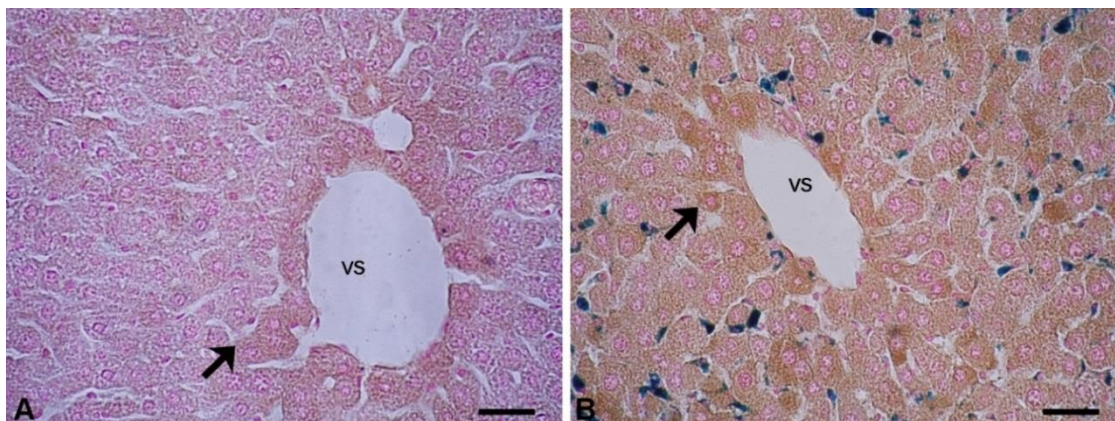


Figura 24. Inmunolocalización de DMT1 en hígado en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) DMT1 en hepatocitos de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** DMT1 en hepatocitos (flecha) y hemosiderina en células de Kupffer (marcación azul) de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). VS: vaso sanguíneo. La barra representa 20 μm .

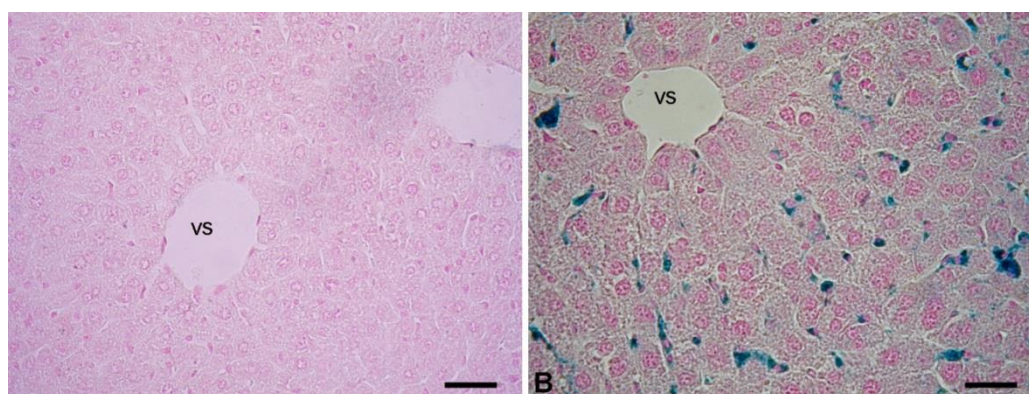


Figura 25. Control negativo del tejido hepático en el Modelo de Sobrecarga de hierro. A) Tejido hepático de ratón con adecuado hierro incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario; **B)** Tejido hepático de ratón con sobrecarga de hierro incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. VS: vaso sanguíneo. La barra representa 20 μm .

2.3.1.3. Transportador ZIP14 hepático

Se sabe que el importador ZIP14 participa en la captación del hierro unido a transferrina (TBI) y del no unido a transferrina (NTBI), forma de hierro presente principalmente en estados de exceso del biometal (Jenkitkasemwong et al., 2012).

Nos propusimos estudiar la relación funcional entre ZIP14 y DMT1 evaluando la existencia o no de una función selectiva de ambos importadores en la captación hepática del hierro ferroso.

La identificación de ZIP14 en el estado de sobrecarga de hierro mostró una intensa inmunomarcación citoplasmática en hepatocitos asociados a vasos sanguíneos (Figura 26B).

En adecuado hierro, los estudios inmunohistoquímicos de ZIP14 mostraron débil expresión del transportador en el citoplasma de hepatocitos asociados a vasos sanguíneos (Figura 26A). En células con morfología similar a células de Kupffer no se detectó expresión de ZIP14 tanto en sobrecarga de hierro como en adecuado hierro (Figuras 26A y B).

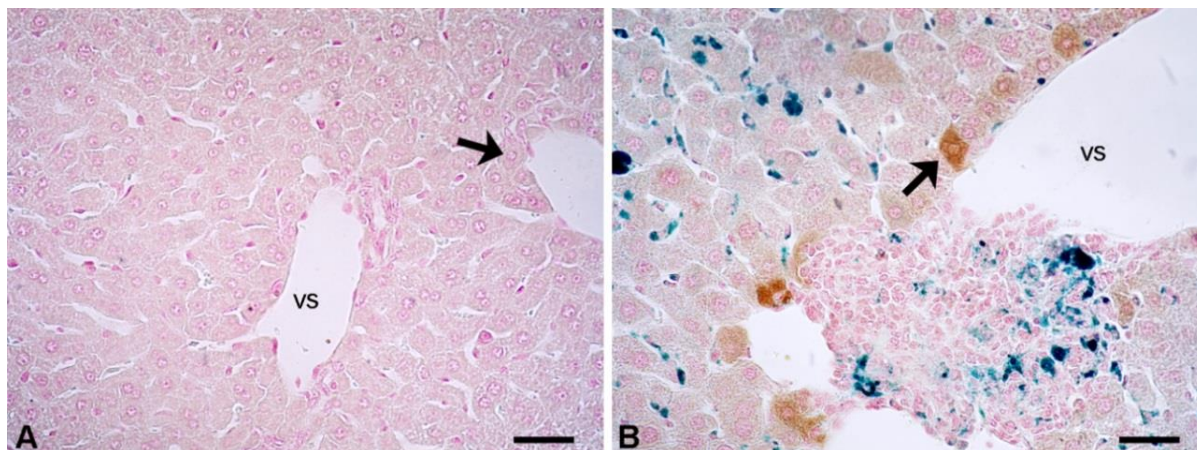


Figura 26. Inmunolocalización de ZIP14 en hígado en el Modelo de Sobrecarga de hierro. A) ZIP14 en hepatocitos de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** ZIP14 en hepatocitos (flecha) y hemosiderina en células de Kupffer (marcación azul) de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). VS: vaso sanguíneo. La barra representa 20 μm .

2.3.1.4. Prohepcidina hepática

La hepcidina es sintetizada principalmente en el hígado como una señal reguladora que coordina los requerimientos de hierro de los distintos tejidos. Hepcidina es un regulador negativo del hierro plasmático, que controla su absorción duodenal y su distribución en todas las células del organismo (Ganz, 2011).

Desde el descubrimiento de la hepcidina, el desarrollo de técnicas que permitan su cuantificación ha sido un desafío debido a la dificultad en la producción de anticuerpos por diversas características estructurales y funcionales que presenta la hepcidina. Estas características incluyen una estructura terciaria compleja, un péptido muy pequeño (25 aminoácidos) y diversas isoformas con escasa actividad biológica (Ganz, 2003). Para la detección de hepcidina sérica en humanos se desarrolló un ensayo de ELISA en el año 2008 (Ganz, 2008). Sin embargo, recién en el año 2015 se desarrolló un ELISA sensible y específico para la detección de hepcidina en suero y en orina de ratón, siendo esta publicación posterior a nuestros estudios (Gutschow et al., 2015).

Teniendo en cuenta las dificultades en el desarrollo de técnicas para medir hepcidina murina estudiamos la expresión tisular de prohepcidina, dado que Valore & Ganz (2008)

identificaron una relación directa entre la síntesis celular de hepcidina y de su pro-péptido denominado prohepcidina.

En adecuado hierro se observó expresión citoplasmática de prohepcidina en hepatocitos cercanos a vasos sanguíneos (Figura 27A). Sin embargo, la inmunomarcación del pro-péptido de hepcidina en sobrecarga de hierro se detectó en la mayoría de los hepatocitos del estroma (Figura 27B). En sobrecarga y en adecuado hierro, las células de Kupffer fueron inmunonegativas para prohepcidina (Figuras 27A y B).

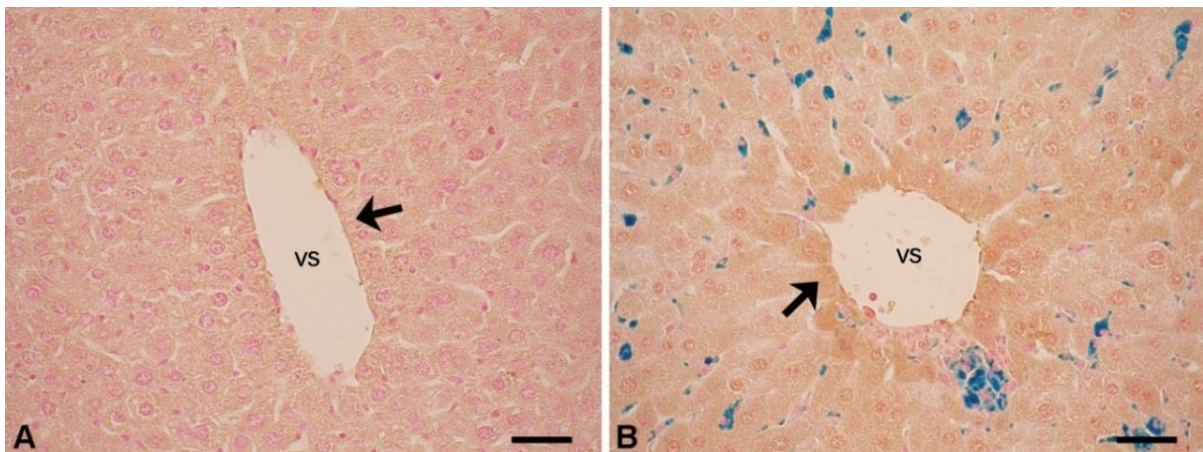


Figura 27. Inmunolocalización de prohepcidina en hígado en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) Prohepcidina en hepatocitos de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** Prohepcidina en hepatocitos (flecha) y hemosiderina en células de Kupffer (marcación azul) de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). VS: vaso sanguíneo. La barra representa 20 µm.

2.3.1.5. L-ferritina hepática

Para evaluar si los cambios en la expresión hepática de DMT1 y ZIP14 se relacionan con el almacenamiento de hierro en el hígado, se analizó la expresión de L-ferritina en este órgano en el Modelo de Sobrecarga de Hierro.

En adecuado hierro, la inmunomarcación de L-ferritina se observó principalmente en los hepatocitos asociados a vasos sanguíneos (Figura 28A). Sin embargo, en exceso de hierro la expresión de L-ferritina se inmunolocalizó en la mayoría de los hepatocitos del estroma (Figura 28B).

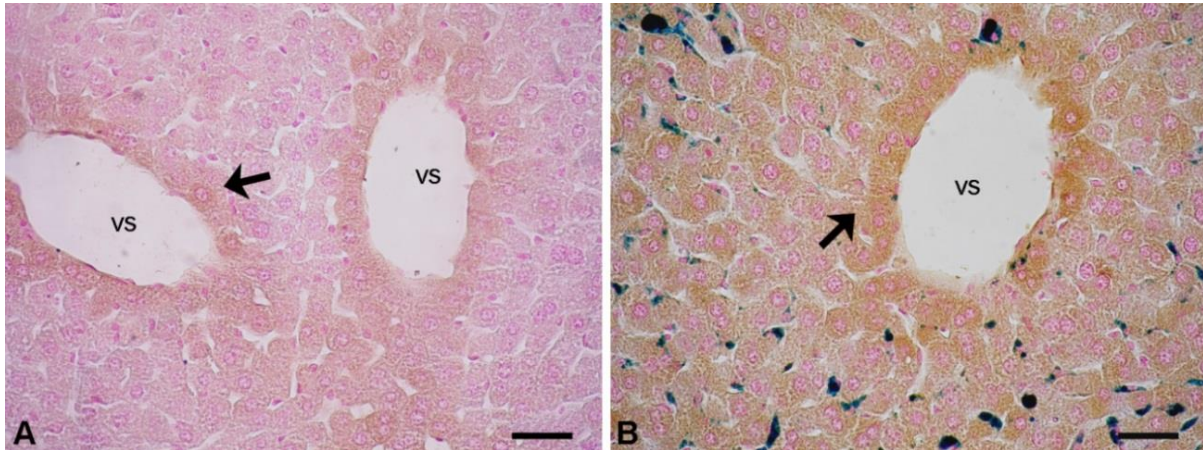


Figura 28. Inmunolocalización de L-ferritina en hígado en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) L-ferritina en hepatocitos de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** L-ferritina en hepatocitos (flecha) y hemosiderina en células de Kupffer (marcación azul) de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). VS: vaso sanguíneo. La barra representa 20 μm .

2.3.2. Modelo de Deficiencia de Hierro

2.3.2.1. Estado del hierro hepático y esplénico

2.3.2.1.1. Estudio cuantitativo del hierro

El nivel tisular de hierro mostró una disminución significativa en hígado y en bazo en deficiencia de hierro respecto al control ($4,02 \pm 0,88 \mu\text{mol/gr tej.}$ vs. $11,50 \pm 2,37 \mu\text{mol/gr tej.}$) y ($3,96 \pm 0,95 \mu\text{mol/gr tej.}$ vs. $25,74 \pm 2,15 \mu\text{mol/gr tej.}$), respectivamente (Figuras 29A y B).

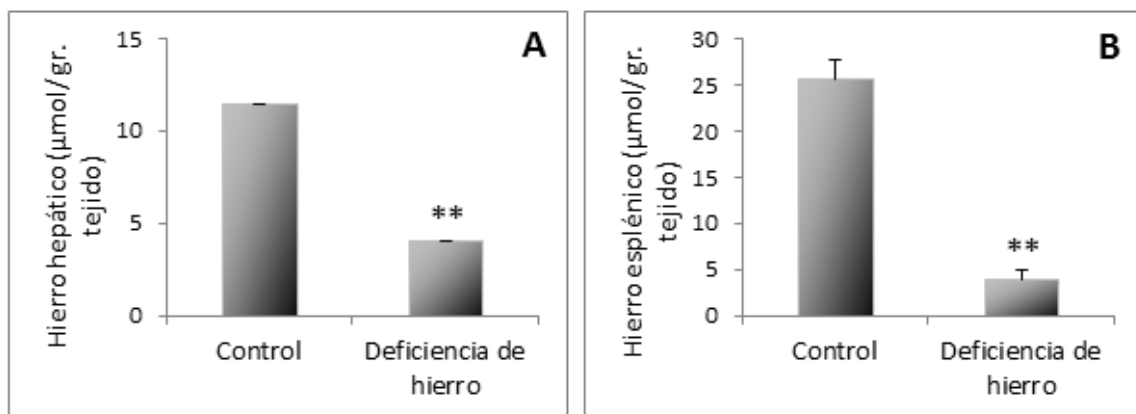


Figura 29. Hierro hepático y esplénico en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) Hierro hepático; **B)** Hierro esplénico. Las muestras tisulares se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos (n=6/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; ** $p < 0,01$ deficiencia de hierro vs. control.

2.3.2.1.2. Estudio cualitativo del hierro

Los depósitos de hemosiderina esplénicos en la condición control fueron muy abundantes en la pulpa roja (Figura 30A). Sin embargo, en deficiencia de hierro se observaron escasos depósitos de hemosiderina en la pulpa roja (Figura 30B). En el hígado no se detectó hemosiderina tanto en deficiencia de hierro como en el control (Figuras 31A y B).

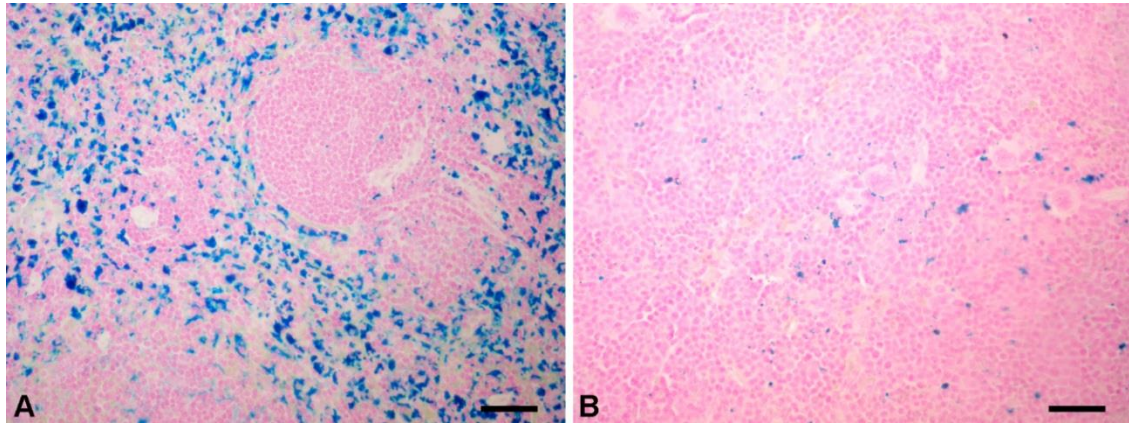


Figura 30. Hemosiderina en bazo en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) Hemosiderina en células de la pulpa roja del bazo de ratón control (marcación azul); **B)** Hemosiderina en células de la pulpa roja del bazo de ratón con deficiencia de hierro (marcación azul). Los tejidos se procesaron para la tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

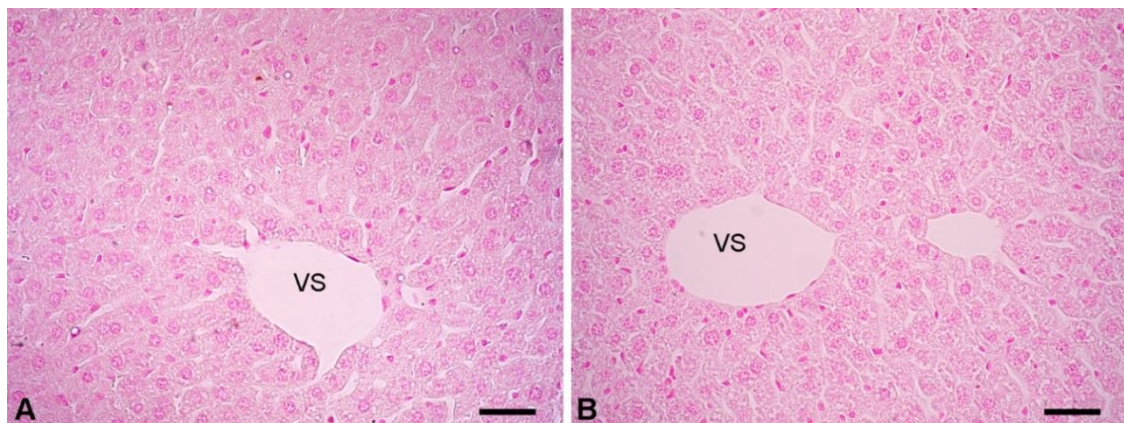


Figura 31. Hemosiderina en hígado en el Modelo de Deficiencia de hierro. A) Ausencia de hemosiderina en hígado de ratón control; **B)** Ausencia de hemosiderina en hígado de ratón con deficiencia de hierro. Los tejidos se procesaron para la tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). VS: vaso sanguíneo. La barra representa 20 μ m.

2.3.2.2. Transportador de metales divalentes 1 duodenal y hepático

2.3.2.2.1. Duodeno

Por inmunohistoquímica se observó que DMT1 se localiza en el citoplasma en enterocitos presentando una distribución homogénea (Figura 32A). En deficiencia de hierro se identificó una intensa expresión de DMT1 localizada en la membrana apical de enterocitos (Figura 32B). Los controles negativos no mostraron inmunoreactividad (Figura 33).

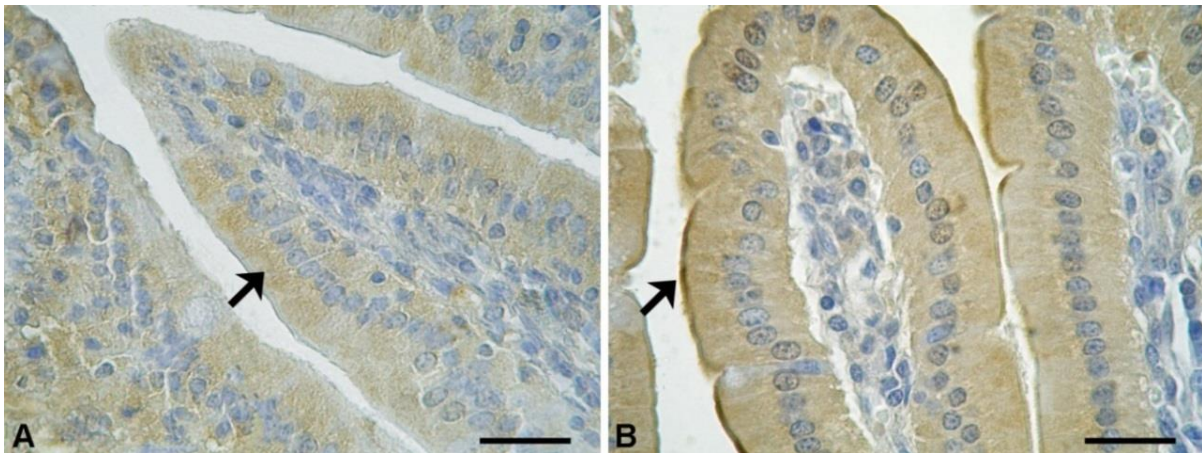


Figura 32. Inmunolocalización de DMT1 en duodeno en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) DMT1 en enterocitos de ratón control (flecha); **B)** DMT1 en enterocitos de ratón con deficiencia de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 µm.

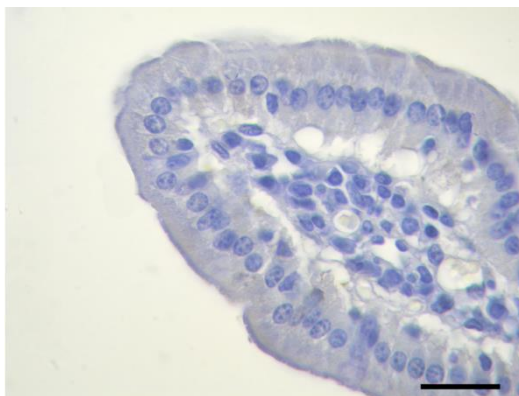


Figura 33. Control negativo del tejido duodenal en el Modelo de Deficiencia de Hierro. Tejido duodenal incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 µm.

2.3.2.2.2. Hígado

La inmunomarcación citoplasmática de DMT1 en hepatocitos fue moderada en la condición control y débil en deficiencia de hierro (Figuras 34A y B). En las células de Kupffer no se detectó inmunomarcación de DMT1 tanto en deficiencia de hierro como en la

condición control (Figuras 34A y B). Los controles negativos no mostraron inmunoreactividad (Figura 35).

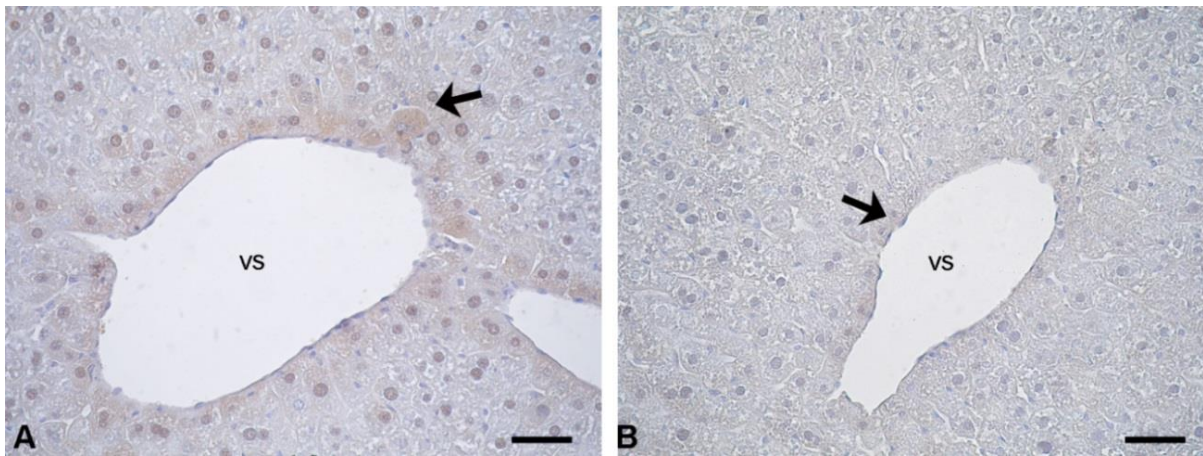


Figura 34. Inmunolocalización de DMT1 en hígado en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) DMT1 en hepatocitos de ratón control (flecha); **B)** DMT1 en hepatocitos de ratón con deficiencia de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). VS: vaso sanguíneo. La barra representa 20 μ m.

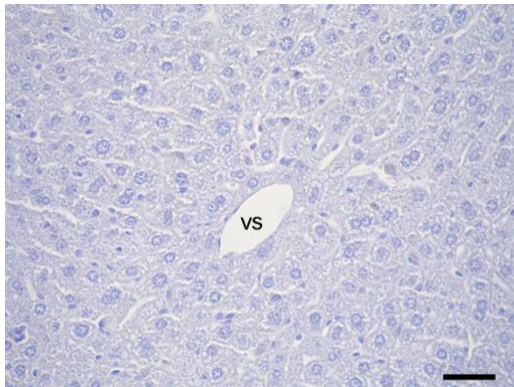


Figura 35. Control negativo del tejido hepático en el Modelo de Deficiencia de hierro. Tejido hepático incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. VS: vaso sanguíneo. La barra representa 20 μ m.

2.3.2.3. L-ferritina hepática

En la condición control se observó abundante expresión citoplasmática de L-ferritina en los hepatocitos del estroma siendo más evidente en los asociados a vasos sanguíneos (Figura 36A). En el modelo de deficiencia de hierro la expresión de L-ferritina fue débil en los hepatocitos asociado a vasos sanguíneos (Figura 36B).

Resultados

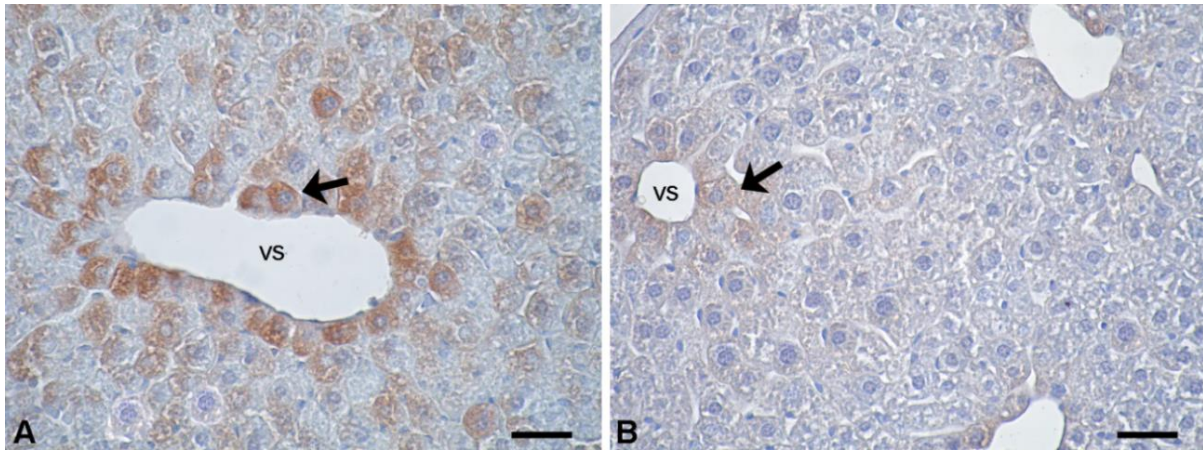


Figura 36. Inmunolocalización de L-ferritina en hígado en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) L-ferritina en hepatocitos de ratón control (flecha); **B)** L-ferritina en hepatocitos de ratón con deficiencia de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). VS: vaso sanguíneo. La barra representa 20 µm.

Capítulo 3

Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro.
Caracterización de las proteínas del hierro
y su regulación en páncreas

3.1 INTRODUCCIÓN

Las células endocrinas del páncreas son susceptible al hierro libre debido a que expresan bajos niveles de las enzimas que participan en la destrucción de especies reactivas de oxígeno evitando el daño oxidativo, como son la catalasa y la superóxido dismutasa (Lenzen et al., 1996). El hierro en exceso como factor etiológico de enfermedades del páncreas endocrino fue descrito por primera vez en la hemocromatosis (Opie, 1899). La base patogénica de esta enfermedad hereditaria se origina por mutaciones del gen de hepcidina y de las proteínas que regulan su síntesis como HJV, HFE y RTf2 y su función como FPN (Beutler, 2006). En la hemocromatosis hereditaria por mutación del gen de hepcidina (HAMP), la reducida síntesis de hepcidina produce sobrecarga de hierro a través de la estabilización del exportador de hierro FPN en la membrana de los enterocitos, produciendo una exacerbada absorción duodenal de hierro (Ulvik, 2015). Los pacientes con hemocromatosis cursan con una alteración de la función pancreática que se manifiesta con una marcada reducción en la síntesis de insulina probablemente por la injuria oxidativa inducida por el hierro libre (Simcox & McClain, 2013).

Aun considerando los avances realizados sobre la relación funcional entre el páncreas y el hierro, se han aclarado parcialmente las vías moleculares que participan en la captación pancreática del exceso de hierro que produce el daño celular.

Nuestros estudios amplían el conocimiento sobre la movilización y el depósito del exceso de hierro pancreático mediado por el importador DMT1, la hormona hepcidina y la proteína de depósito ferritina.

3.2. DESCRIPCIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL PÁNCREAS

El páncreas es un órgano situado retroperitonealmente a nivel de la segunda y tercera vértebras lumbares que se divide en tres regiones denominadas cabeza, cuello y cola. Este órgano se encuentra recubierto por una cápsula delgada de tejido conectivo laxo que subdividen al tejido glandular en lobulillos.

El páncreas está formado por dos regiones estructural y funcionalmente diferenciadas, denominadas páncreas exocrino y páncreas endocrino.

El páncreas endocrino sintetiza y libera hacia la sangre hormonas que regulan el metabolismo de la glucosa, los lípidos y las proteínas. La zona endocrina del páncreas se

divide en agrupaciones celulares pequeñas (1-2 % del volumen total) llamadas islotes de Langerhans que se distribuyen en toda la glándula, siendo más numerosos en la cola.

Las células que componen los islotes de Langerhans forman una masa compacta de células epiteliales en cuyo centro hay una red de capilares. Las células endocrinas están polarizadas hacia éstos capilares para liberar las hormonas que sintetizan hacia la circulación. Los islotes están separados del tejido acinar adyacente por una fina capa de fibras reticulares que se extiende hacia su interior revistiendo los capilares. Se observan cuatro tipos principales de células endocrinas en los islotes, cada uno de los cuales secreta una hormona diferente: células α (células A) que secretan glucagón; células β (células B) que secretan insulina; células δ (células D) que secretan somatostatina, y células F que secretan polipéptido pancreático. En todos los tipos celulares, el contenido de los gránulos de secreción se libera mediante exocitosis hacia el espacio extracelular en donde se dispersa para actuar sobre las células adyacentes dentro del mismo islote o para liberarse a la circulación sanguínea a través de los poros que presentan los capilares (Figura 37).

El páncreas exocrino sintetiza y secreta, hacia el duodeno, enzimas que son indispensables para la digestión. La zona del páncreas exocrino es una glándula acinar dividida en lobulillos que están unidos entre sí por tejido conectivo, donde están presentes los vasos sanguíneos y linfáticos, los nervios y los conductos interlobulillares. Los acinos pancreáticos son estructuras redondas u ovaladas formadas por células epiteliales piramidales denominadas células acinares, que se ubican en una capa única alrededor de la luz. En el interior de algunos acinos pancreáticos se distinguen células más pálidas denominadas células centroacinares (Figura 37).

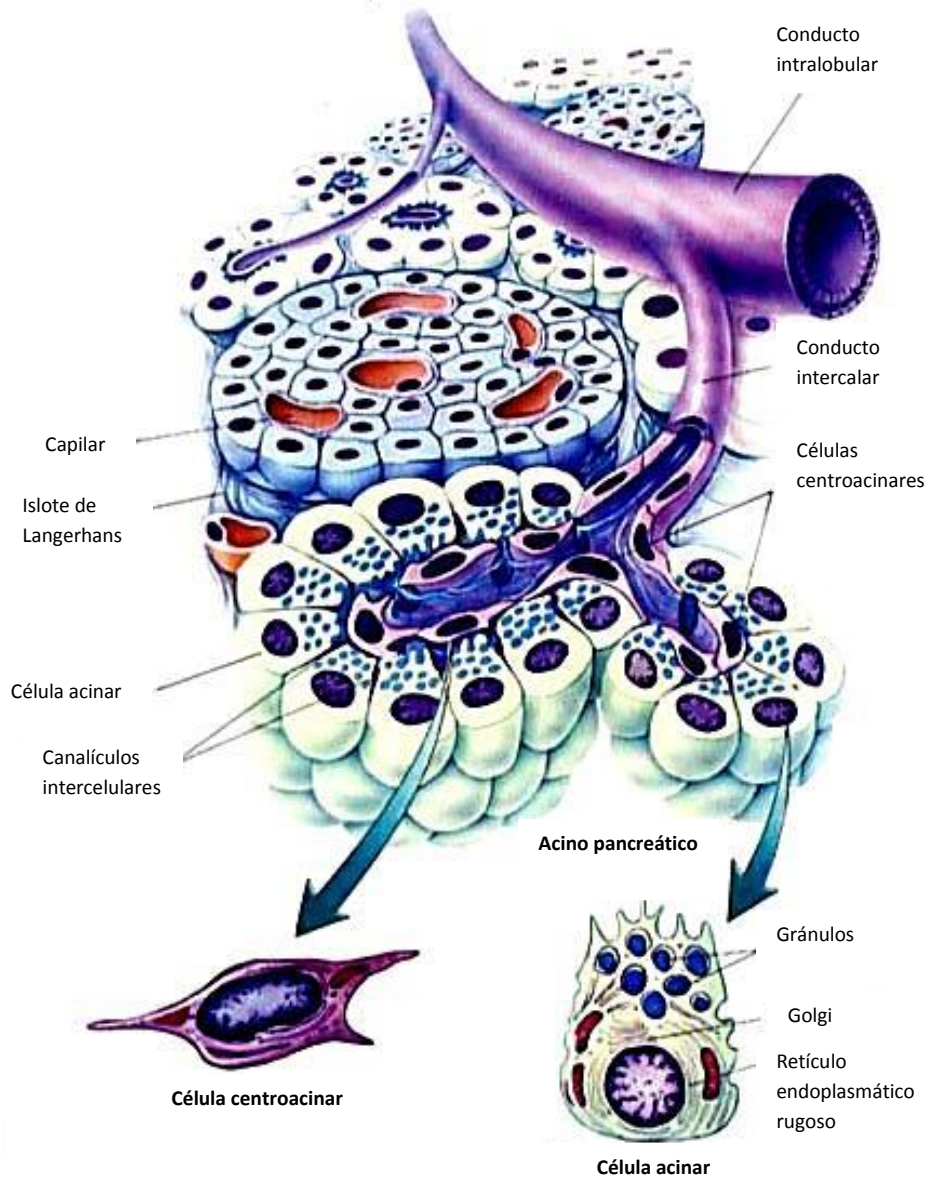


Figura 37. Diagrama esquemático del páncreas.
Gartner y Hiatt. Atlas Color Histología. 4° edición (1998)

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Estado del hierro pancreático

3.3.1.1. Estudio cuantitativo del hierro

En sobrecarga de hierro se observó un aumento significativo del hierro pancreático ($106,96 \pm 0,30 \mu\text{mol/gr tej}$) comparado con el estado de adecuado hierro ($0,30 \pm 0,19 \mu\text{mol/gr tej}$) (Figura 38).

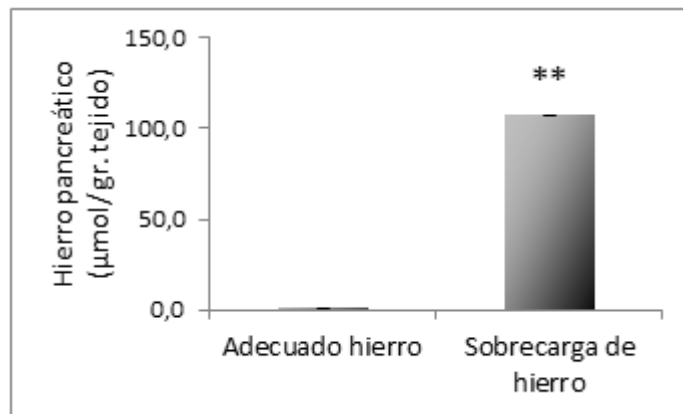


Figura 38. Hierro pancreático en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. Ratones con sobrecarga de hierro inducida por la administración de Hierro-Sacarato los días 0, 5, 10 y 15 del protocolo experimental (dosis total= 1,3 g/Kg peso); a ratones con adecuado hierro (control) se les administró solución fisiológica. Las muestras tisulares se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos (n=6/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; ** p < 0.01 sobrecarga de hierro vs. adecuado hierro.

3.3.1.2. Estudio cualitativo del hierro

Cuando se analizó la distribución de hemosiderina en exceso de hierro se observó su presencia en las células del tejido conectivo interlobulillar y perilobulillar de la zona acinar (Figuras 39B y D). En adecuado hierro no se observó depósito de hemosiderina en el tejido pancreático (Figuras 39A y C).

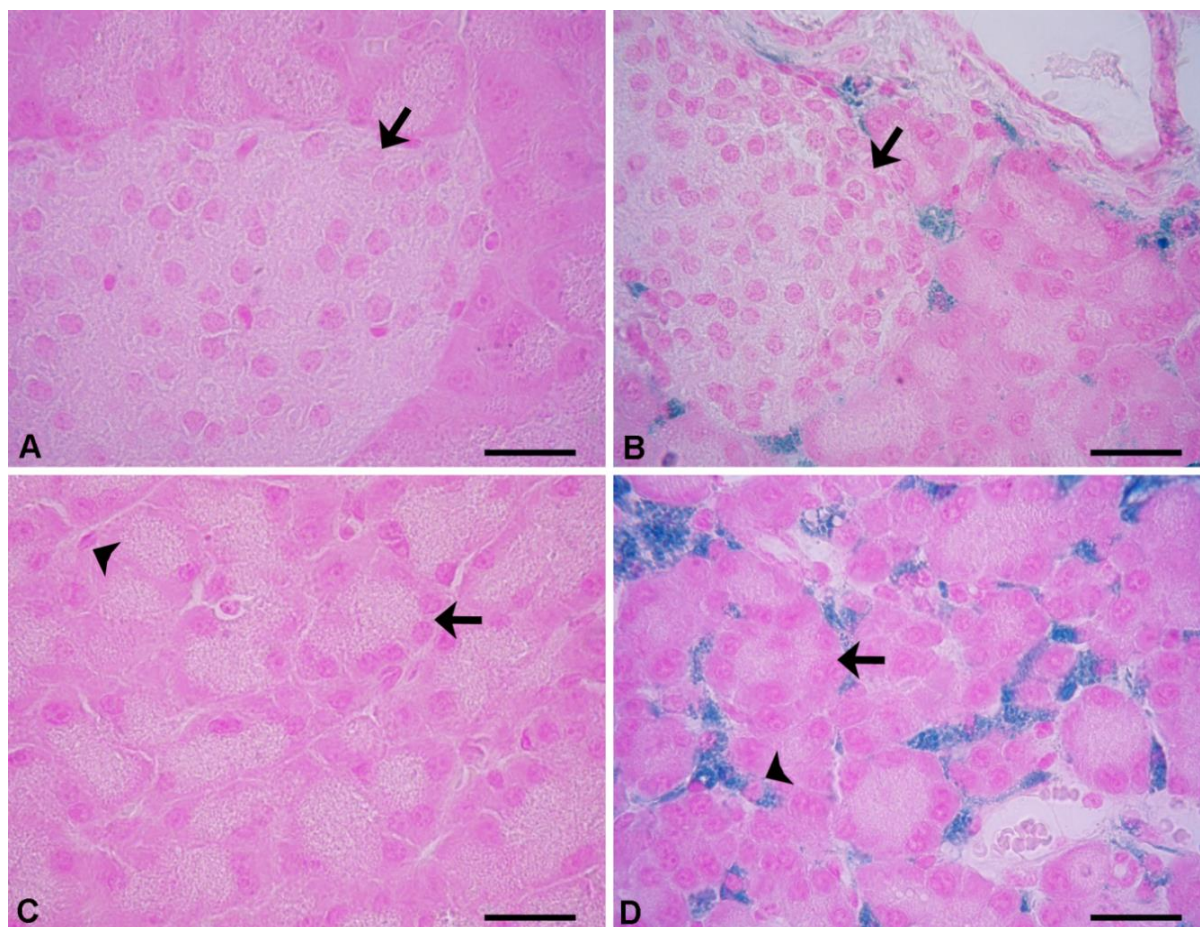


Figura 39. Hemosiderina en páncreas en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. **A)** Ausencia de hemosiderina en células del islote de Langerhans en el páncreas de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** Ausencia de hemosiderina en células del islote de Langerhans en el páncreas de ratón con sobrecarga de hierro (flecha); **C)** Ausencia de hemosiderina en células acinares (flecha) y en células del tejido conectivo (punta de flecha) en el páncreas de ratón con adecuado hierro; **D)** Ausencia de hemosiderina en células acinares (flecha) y presencia de hemosiderina en células del tejido conectivo (punta de flecha) en el páncreas de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para la tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μm .

3.3.2. Transportador de metales divalentes 1 pancreático

Por inmunohistoquímica identificamos a DMT1 en el tejido pancreático, principalmente localizado en las células de los islotes de Langerhans en el estado de adecuado hierro (control) (Figura 40A). En sobrecarga de hierro la expresión de DMT1 en los islotes fue menos evidente respecto al control (Figura 40B). Los controles negativos no mostraron inmunoreactividad (Figuras 41A y B).

La menor inmunomarcación de DMT1 en exceso de hierro respecto al estado de adecuado hierro, fue confirmada por la técnica de *Western blot* (Figura 42).

Resultados

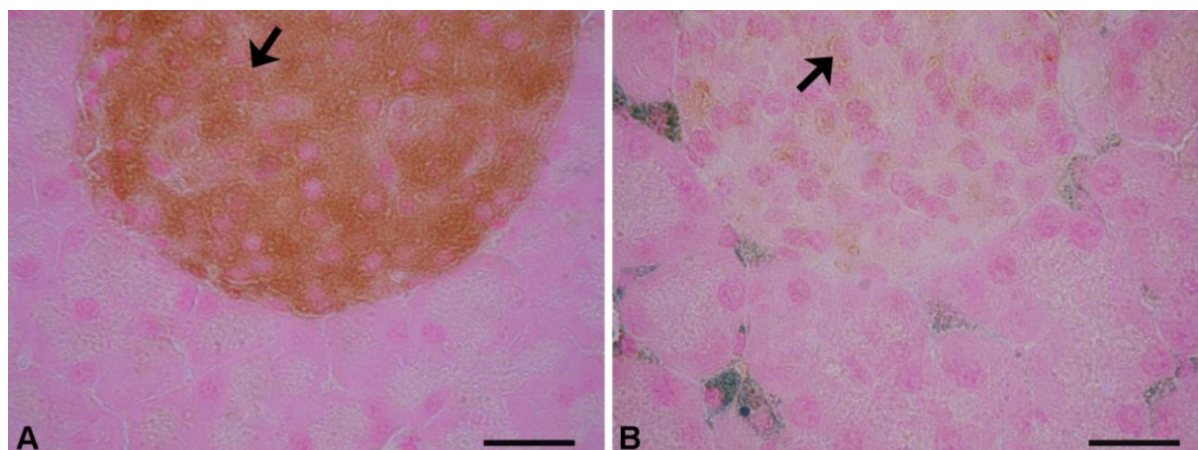


Figura 40. Inmunolocalización de DMT1 en páncreas en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) DMT1 en células del islote de Langerhans de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** DMT1 en células del islote de Langerhans de ratón con sobrecarga de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μm .

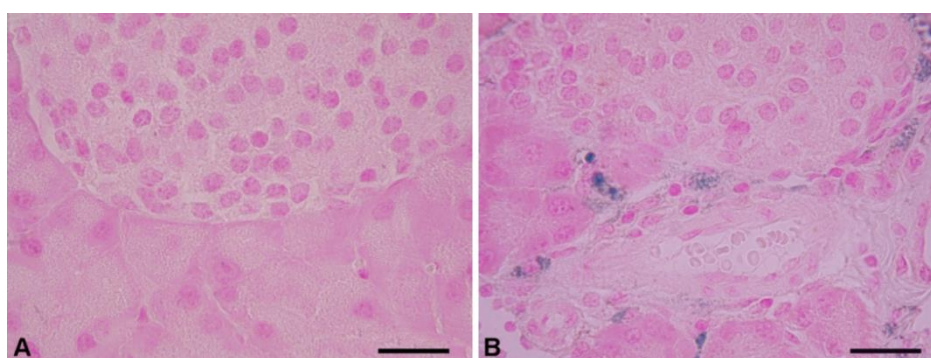


Figura 41. Control negativo del tejido pancreático en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) Tejido pancreático de ratón con adecuado hierro incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario; **B)** Tejido pancreático de ratón con sobrecarga de hierro incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 μm .

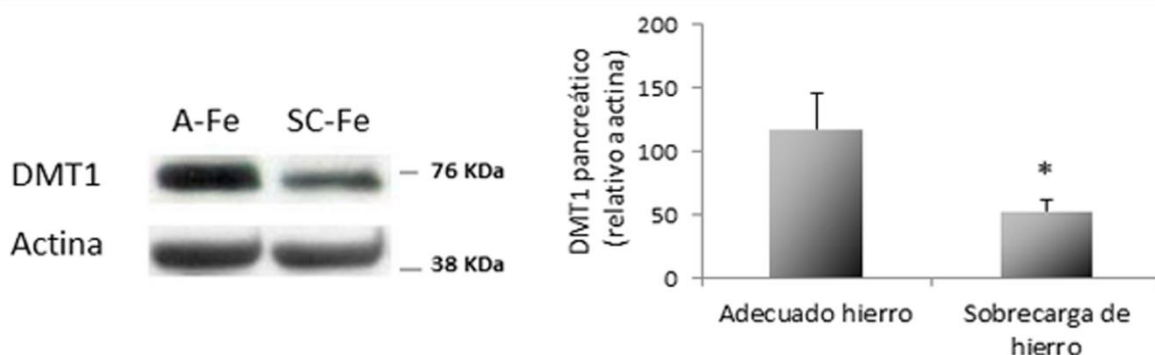


Figura 42. Western blot de DMT1 pancreático en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. AFe: DMT1 en páncreas de ratón con adecuado hierro; **SCFe:** DMT1 en páncreas de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; * $p < 0.05$ sobrecarga de hierro vs. adecuado hierro.

3.3.3. Prohepcidina pancreática

Como describimos anteriormente, el estudio de la molécula hepcidina (péptido maduro) se llevó a cabo caracterizando la expresión de la prohepcidina (pro-péptido) dada la relación directa descrita entre ambas moléculas (Valore & Ganz, 2008).

En sobrecarga y en adecuado hierro, prohepcidina fue identificada en las células de los islotes de Langerhans (Figuras 43A y B). En adecuado hierro escasas células endocrinas fueron inmunopositivas para prohepcidina, mientras que en sobrecarga de hierro aumentó la inmunomarcación del pro-péptido (Figuras 43A y B).

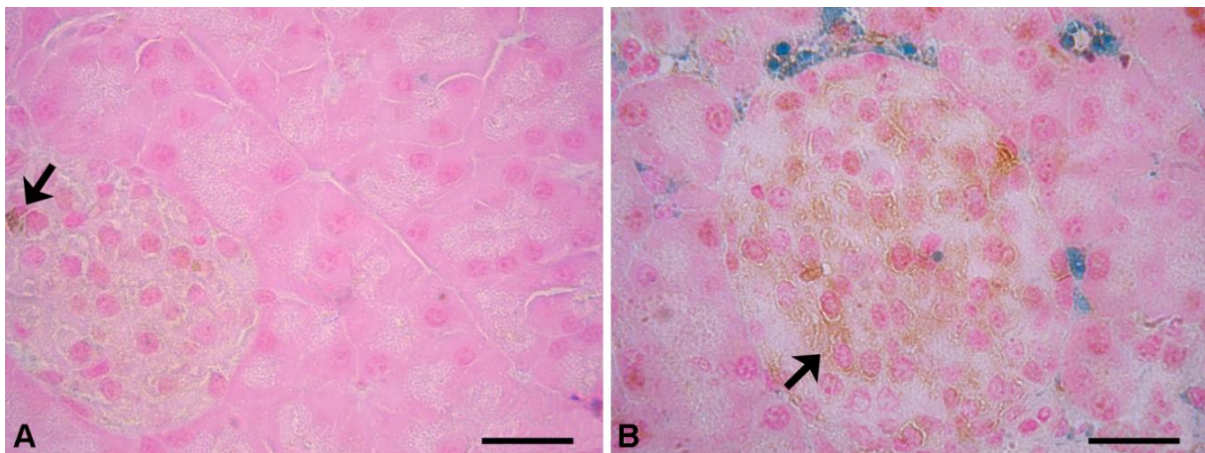


Figura 43. Inmunolocalización de prohepcidina en páncreas en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) Prohepcidina en células del islote de Langerhans de ratón con adecuado hierro (Flecha); **B)** Prohepcidina en células del islote de Langerhans de ratón con sobrecarga de hierro (Flecha). Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 µm.

3.3.4. L-ferritina pancreática

La inmunomarcación de L-ferritina en los islotes de Langerhans fue intensa en adecuado hierro (control) y débil en sobrecarga de hierro (Figuras 44A y B). En el control no se detectó inmunomarcación de L-ferritina en la zona acinar (Figura 44C). En exceso de hierro se identificó evidente expresión de L-ferritina en células acinares y en células del tejido conectivo interlobulillar y perilobulillar (Figura 44D).

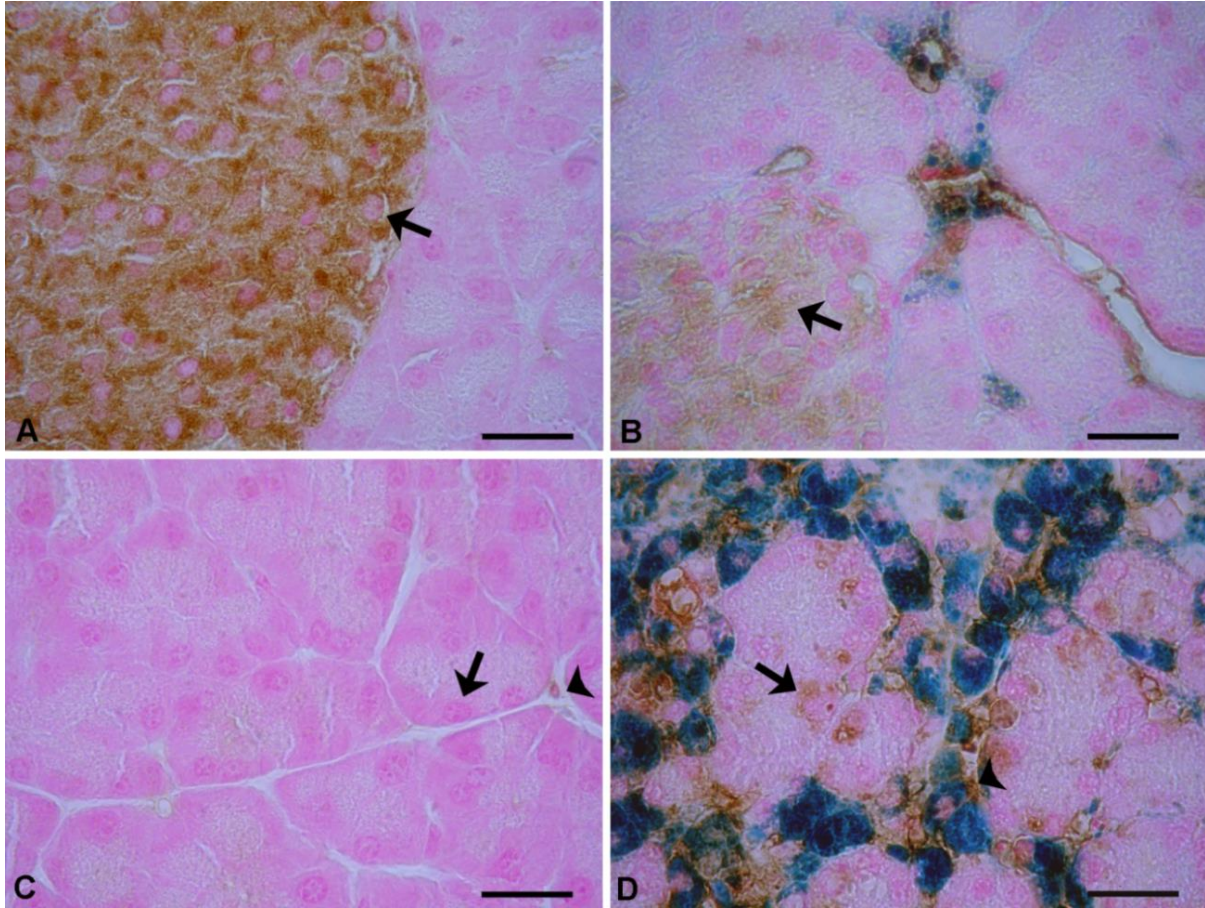


Figura 44. Inmunolocalización de L-ferritina en páncreas en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) L-ferritina en células del islote de Langerhans de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** L-ferritina en células del islote de Langerhans de ratón con sobrecarga de hierro (flecha); **C)** Ausencia de L-ferritina en células acinares (flecha) y en células del tejido conectivo (punta de flecha) de ratón con adecuado hierro; **D)** L-ferritina en células acinares (flecha) y en células del tejido conectivo (punta de flecha) de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

Capítulo 4

Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro.
Caracterización de las proteínas del hierro
y su regulación en riñón

4.1. INTRODUCCIÓN

La identificación y caracterización de hepcidina en nuestro laboratorio nos alentó a avanzar en el estudio del ciclo del hierro y sus alteraciones en el riñón (Veuthey et al., 2008). La relación entre la enfermedad renal y el hierro se ha descrito en patologías renales que presentan aumento de los niveles de hierro de etiología diversa (Shah et al., 2007). Sin embargo, las vías moleculares que median la sobrecarga de hierro en este órgano no han sido totalmente aclaradas.

A continuación describiremos como abordamos estudios integrativos de las proteínas del hierro, evaluando la regulación de hepcidina y de los transportadores de hierro como RTf1, ZIP14 y DMT1, en Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro.

4.2. DESCRIPCIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL RIÑÓN

Lo riñones forman parte del sistema urinario. La estructura y función están estrechamente relacionadas en el riñón. Por lo tanto, es necesario realizar una descripción de la anatomía macroscópica y de las características histológicas del riñón, para comprender aspectos de la función renal relacionados con nuestros estudios del metabolismo del hierro.

Los riñones son órganos pares situados 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 región 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 un 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 ultraestructura de la nefrona, unidad funcional renal, se compone de un corpúsculo renal o glomérulo, túbulo proximal, asa de Henle ascendente y descendente, túbulo distal y sistema de túbulos colectores (Figura 45). 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 intensamente amplificada, o borde en cepillo, que está solo presente en este túbulo. La membrana basolateral (lado sanguíneo de estas células) presenta numerosa 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.

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.

Resultados

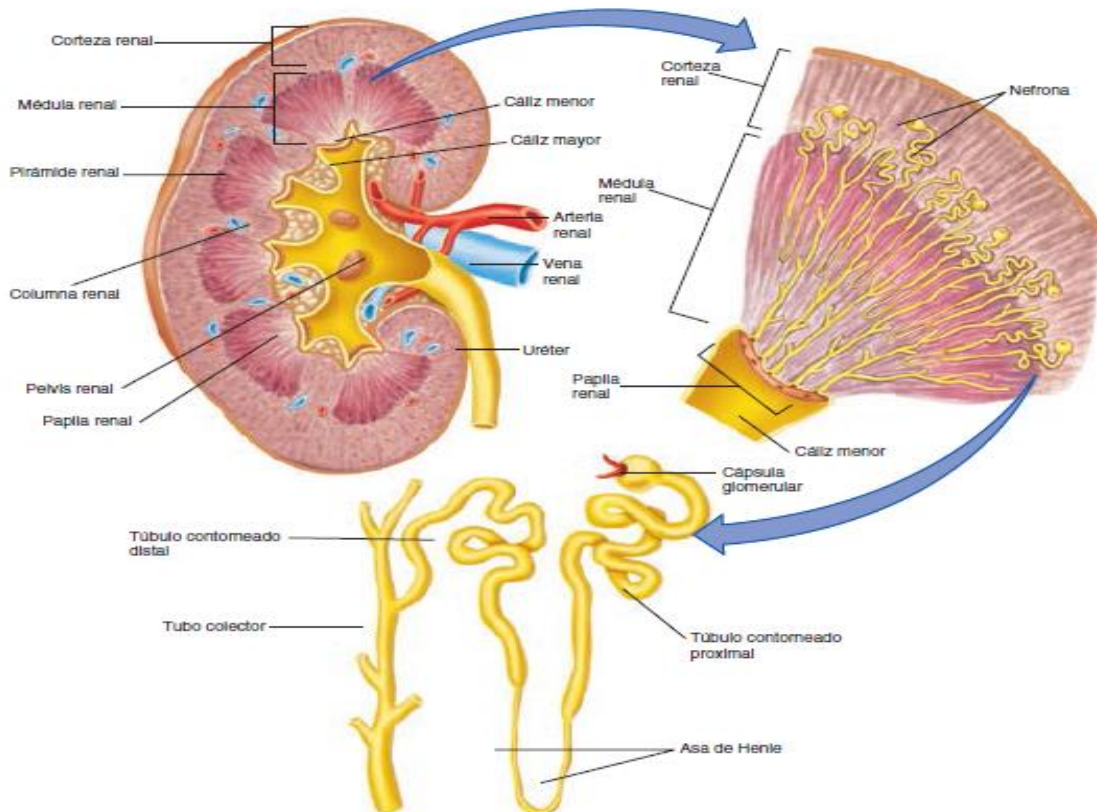


Figura 45. Diagrama esquemático del riñón
Stuart Ira Fox. Doceava Edición.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Modelo de Sobrecarga de Hierro

4.3.1.1. Estado del hierro renal

4.3.1.1.1. Estudio cuantitativo del hierro

En sobrecarga de hierro se observó un aumento significativo del hierro renal ($7,20 \pm 0,60 \mu\text{mol}/\text{gr tej.}$) comparado con la condición de adecuado hierro ($2,60 \pm 1,30 \mu\text{mol}/\text{gr tej.}$) (Figura 46).

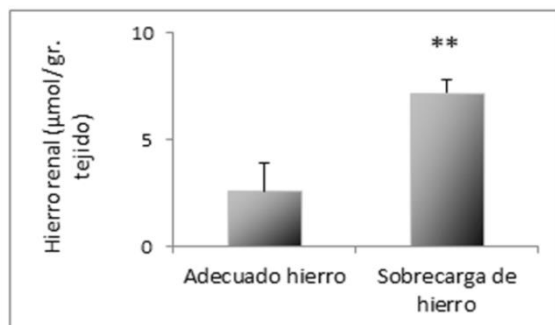


Figura 46. Hierro renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro.

Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=6/\text{grupo}$). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; ** $p < 0.01$ sobrecarga de hierro vs. adecuado hierro.

4.3.1.1.2. Estudio cualitativo del hierro

La Tinción de Perl's evidenció la ausencia de hemosiderina en el tejido renal cortical en adecuado hierro (Figuras 47A y C). En exceso de hierro se detectó abundante hemosiderina en la corteza renal, localizada en glomérulos y en túbulos proximales identificados según su morfología (Figura 47B y D). El estudio de la distribución de hemosiderina en los segmentos de estos túbulo en sobrecarga de hierro mostró localización de los depósitos en los segmentos S1 y S2 (Figura 47D). En la médula renal interna y externa no se observó hemosiderina en sobrecarga y en adecuado hierro (Figuras 48A-D).

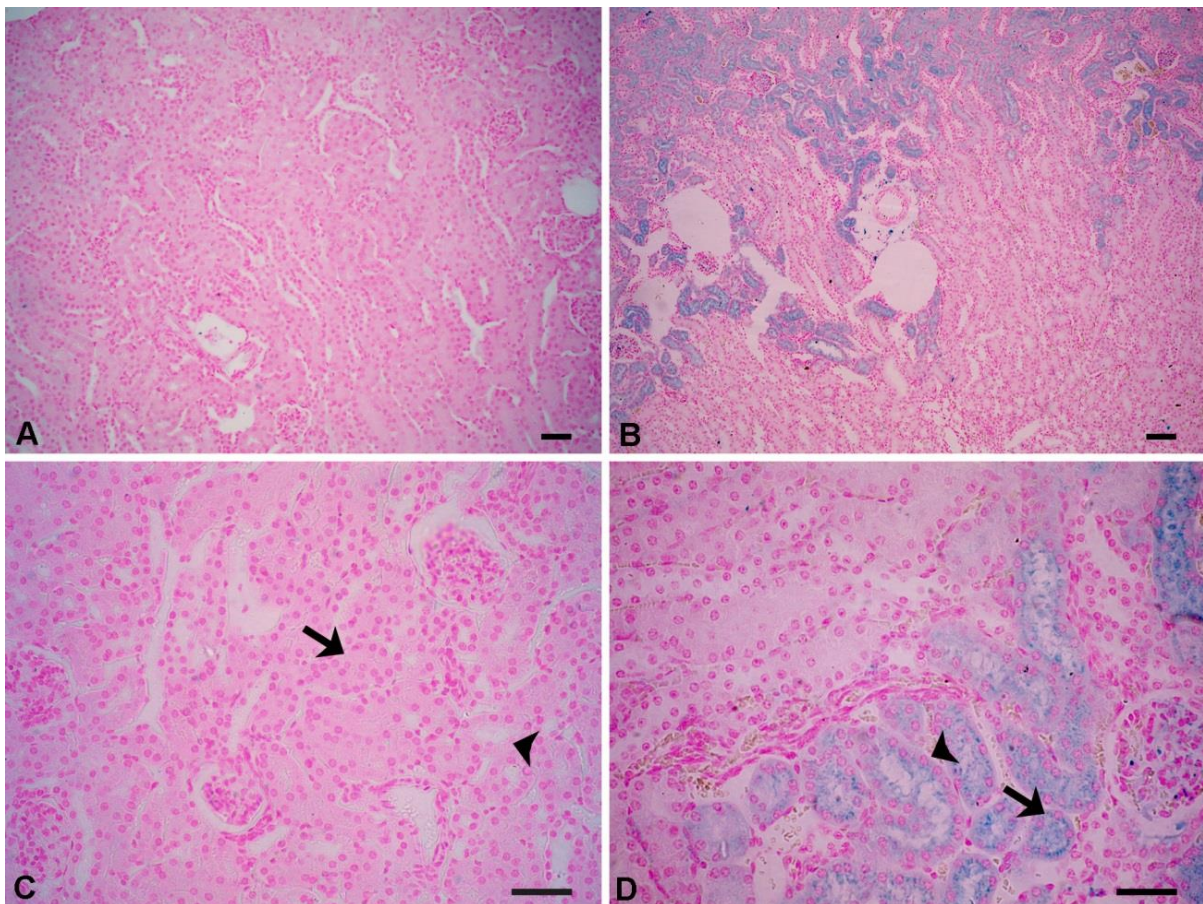


Figura 47. Hemosiderina en corteza renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) Ausencia de hemosiderina en corteza en ratón con adecuado hierro; **B)** Hemosiderina en corteza de ratón con sobrecarga de hierro (marcación azul); **C)** Ausencia de hemosiderina en el glomérulo (G) y en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón con adecuado hierro; **D)** Hemosiderina en el glomérulo (G) y en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para la tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

Resultados

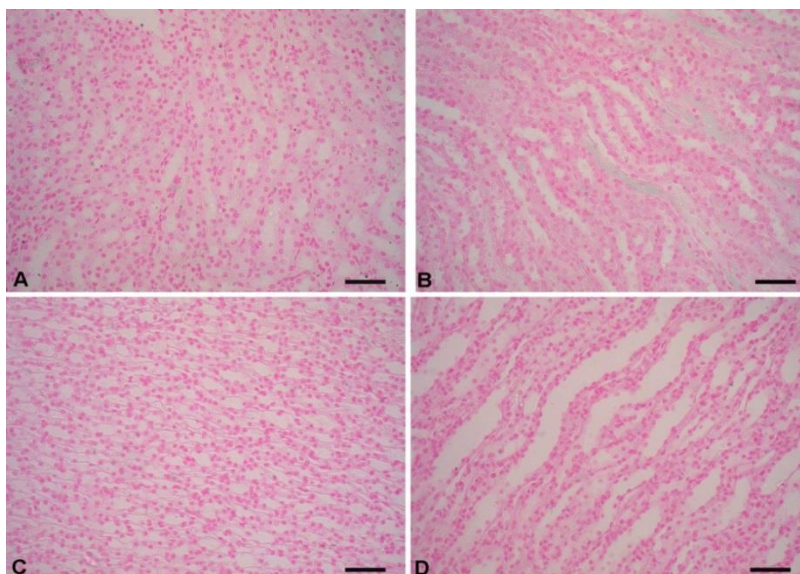


Figura 48. Hemosiderina en médula renal en el Modelo de Sobrecarga de hierro. **A)** Ausencia de hemosiderina en médula externa de ratón con adecuado hierro; **B)** Ausencia de hemosiderina en médula externa de ratón con sobrecarga de hierro; **C)** Ausencia de hemosiderina en médula interna de ratón con adecuado hierro; **D)** Ausencia de hemosiderina en médula interna de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para la tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

4.3.1.2. Transportador de metales divalentes 1 renal

En adecuado hierro (control), la inmunolocalización cortical del importador DMT1 fue evidente en los túbulos proximales (Figura 49A). Cuando se analizó la presencia de DMT1 en los distintos segmentos tubulares se observó una intensa inmunomarcación citoplasmática en las células tubulares del segmento S2 y débil en las células de los segmentos S1 y S3 (Figuras 49C y E). En sobrecarga de hierro la inmunomarcación de DMT1 en túbulos proximales corticales fue menos evidente que la observada en el control (Figura 49B). El análisis de la distribución de DMT1 en los segmentos tubulares mostró una inmunomarcación citoplasmática débil en las células epiteliales del segmento S2 y no se observó en las células de los segmentos S1 y S3 (Figuras 49D y F). El análisis de la zona medular renal en la condición con sobrecarga de hierro evidenció una marcación citoplasmática de DMT1 menos intensa en las células tubulares de la médula interna, respecto a la condición con adecuado hierro (Figuras 50C y D). En la médula externa no se observó inmunomarcación de DMT1 en ambas condiciones estudiadas (Figuras 50A y B). En los controles negativos no se detectó inmunoreactividad (Figuras 51A-D).

Resultados

Por *Western blot* confirmamos que la expresión de DMT1 en riñón en exceso de hierro disminuyó significativamente en adecuado hierro (Figura 52).

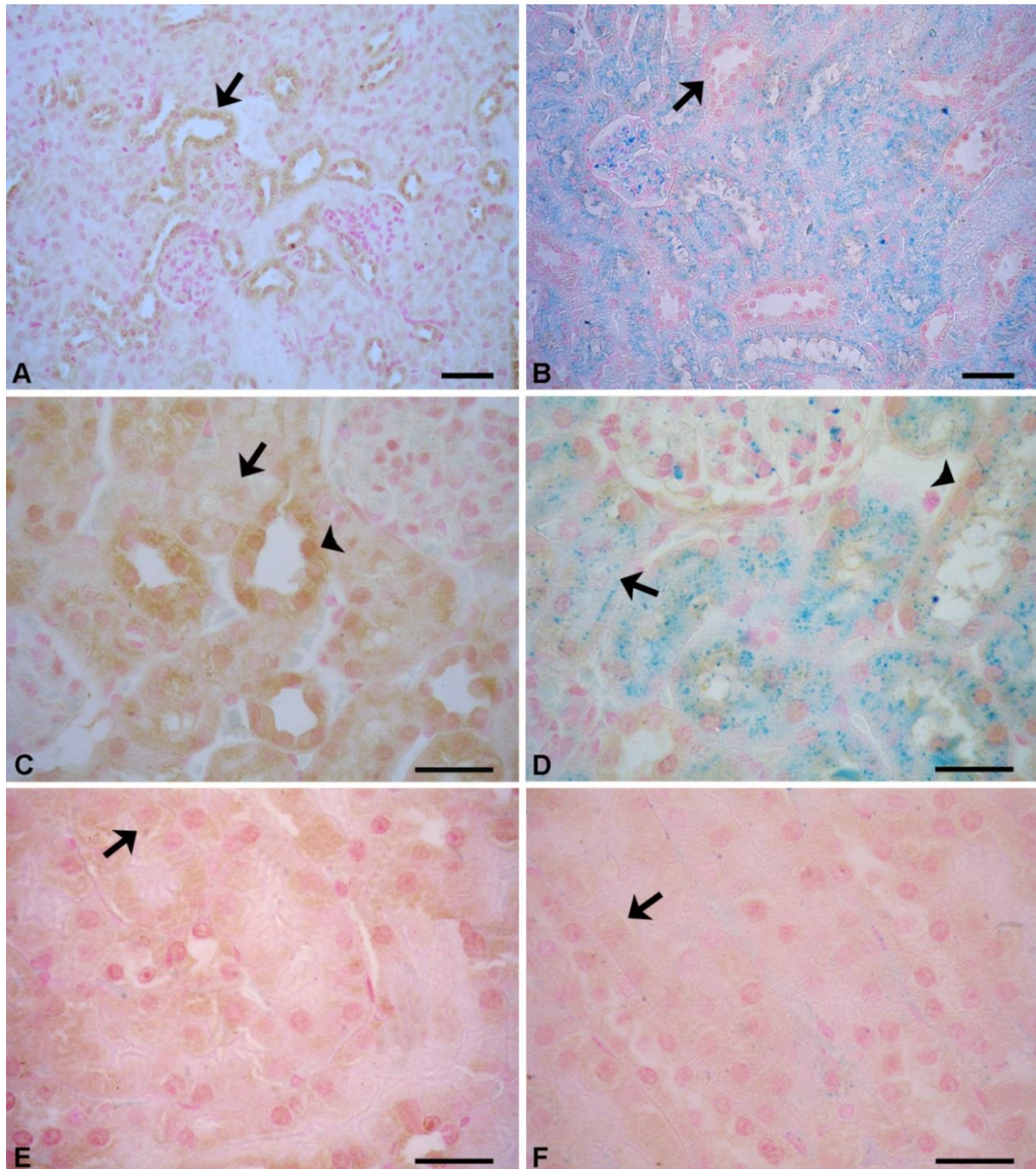


Figura 49. Inmunolocalización de DMT1 en corteza renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) DMT1 en corteza de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** DMT1 en corteza de ratón con sobrecarga de hierro (flecha); **C)** DMT1 en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón con adecuado hierro; **D)** DMT1 en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón con sobrecarga de hierro; **E)** DMT1 en segmentos S3 del túbulo proximal de ratón con adecuado hierro (flecha); **F)** DMT1 en segmentos S3 del túbulo proximal de ratón con sobrecarga de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción (inmunohistoquímica + tinción de Perl's) según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μm .

Resultados

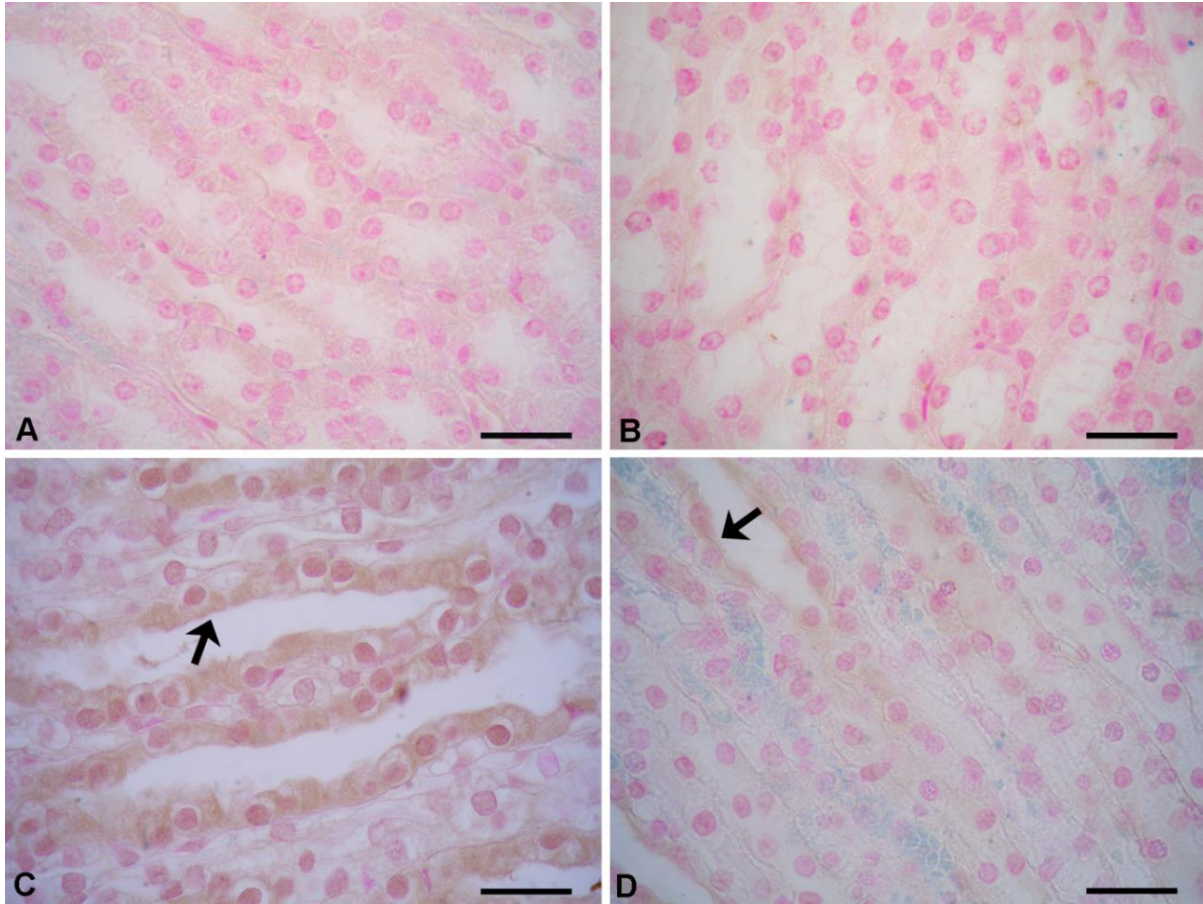


Figura 50. Inmunolocalización de DMT1 en médula en el Modelo de Sobrecarga de hierro. **A)** Ausencia de DMT1 en médula externa de ratón con adecuado hierro; **B)** Ausencia de DMT1 en médula externa de ratón con sobrecarga de hierro; **C)** DMT1 en médula interna de ratón con adecuado hierro (flecha); **D)** DMT1 en médula interna de ratón con sobrecarga de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μm .

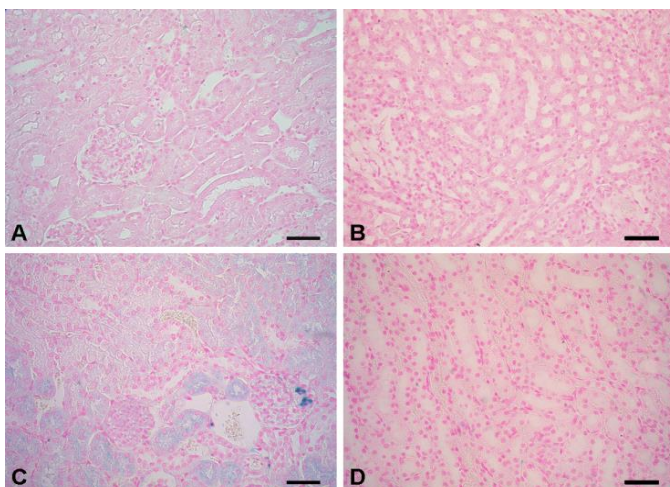


Figura 51. Control negativo del tejido renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. Tejido renal incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario. **A)** Corteza renal de ratón con adecuado hierro; **B)** Médula renal de ratón con adecuado hierro; **C)** Corteza renal de ratón con sobrecarga de hierro; **D)** Médula renal de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 μm .

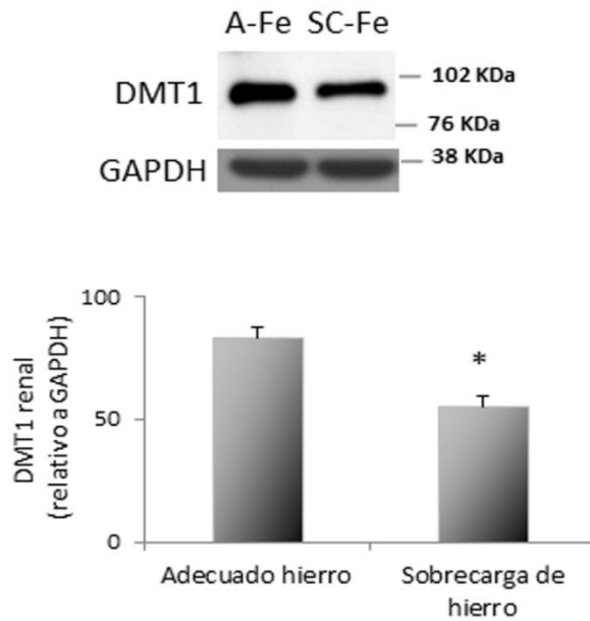


Figura 52. Western blot de DMT1 renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. AFe: DMT1 en riñón de ratón con adecuado hierro; SCFe: DMT1 de riñón en ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo); * p < 0.05 sobrecarga de hierro vs. adecuado hierro.

4.3.1.3. Receptor de transferrina 1 renal

La expresión del RTf1 en adecuado hierro fue evidente en túbulo proximal cortical (Figura 53A). Cuando se analizó la presencia del RTf1 en los distintos segmentos tubulares se observó que en las células tubulares del segmento S2 fue más intensa que en las células de los segmentos S1 y S3, con localización citoplasmática (Figuras 53C y E). En exceso de hierro la expresión del RTf1 en el túbulo proximal fue débil respecto a la condición control (adecuado hierro) (Figura 53B). Cuando se analizó la inmunomarcación del RTf1 en cada segmento tubular, se lo identificó en el citoplasma de las células epiteliales del segmento S2 y no en las células de los segmentos S1 y S3 (Figuras 53D y F). En la médula interna, la inmunomarcación del RTf1 fue evidente en la membrana apical de las células tubulares en adecuado hierro (Figura 54C). Sin embargo, su expresión en exceso de hierro fue débil y se localizó en el citoplasma de las células de la médula interna (Figura 54D).

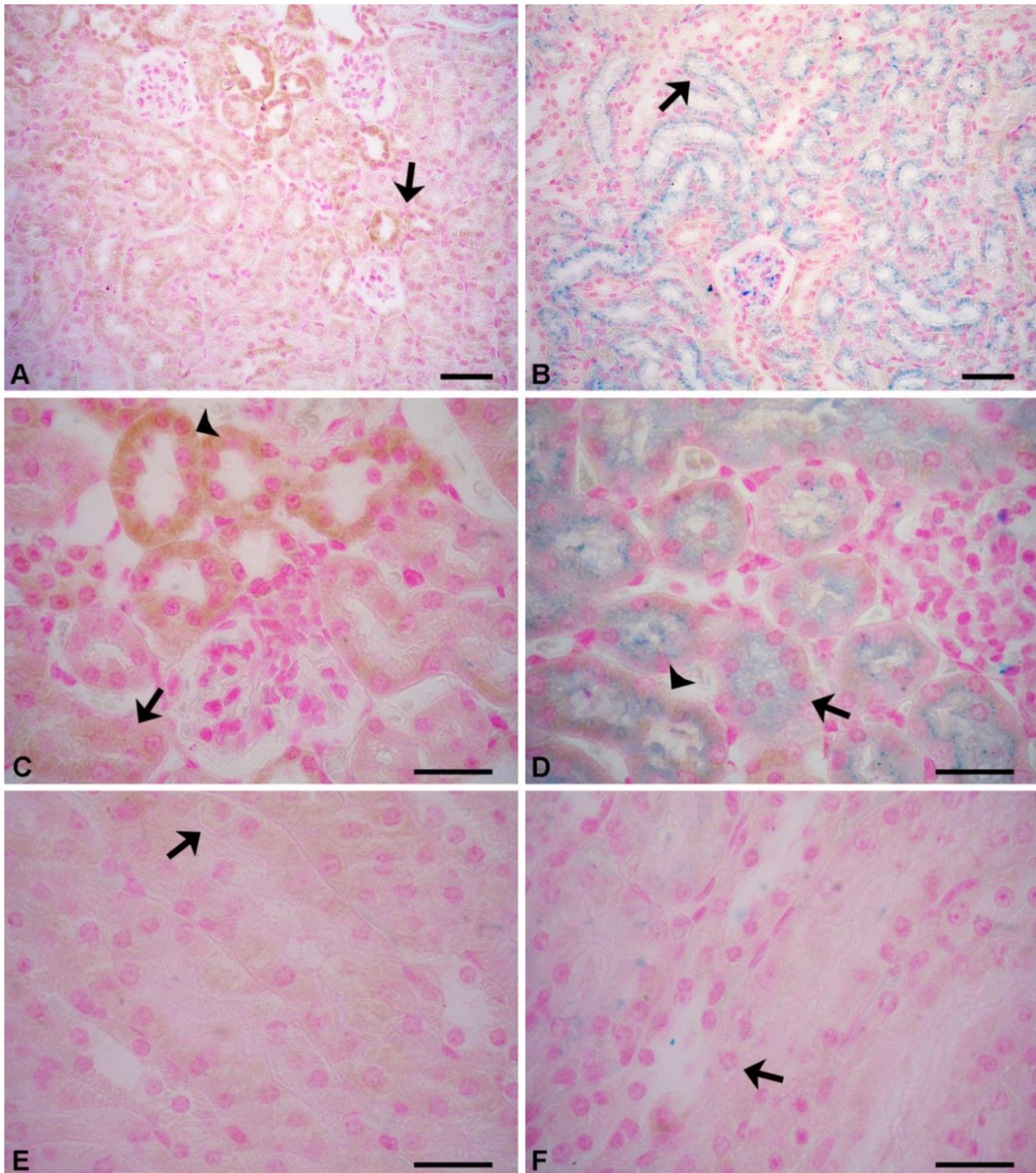


Figura 53. Inmunolocalización del RTf1 en corteza renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) RTf1 en corteza de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** RTf1 en corteza de ratón con sobrecarga de hierro (flecha); **C)** RTf1 en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón con adecuado hierro; **D)** RTf1 en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón con sobrecarga de hierro; **E)** RTf1 en segmentos S3 del túbulo proximal de ratón con adecuado hierro (flecha); **F)** RTf1 en segmentos S3 del túbulo proximal de ratón con sobrecarga de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

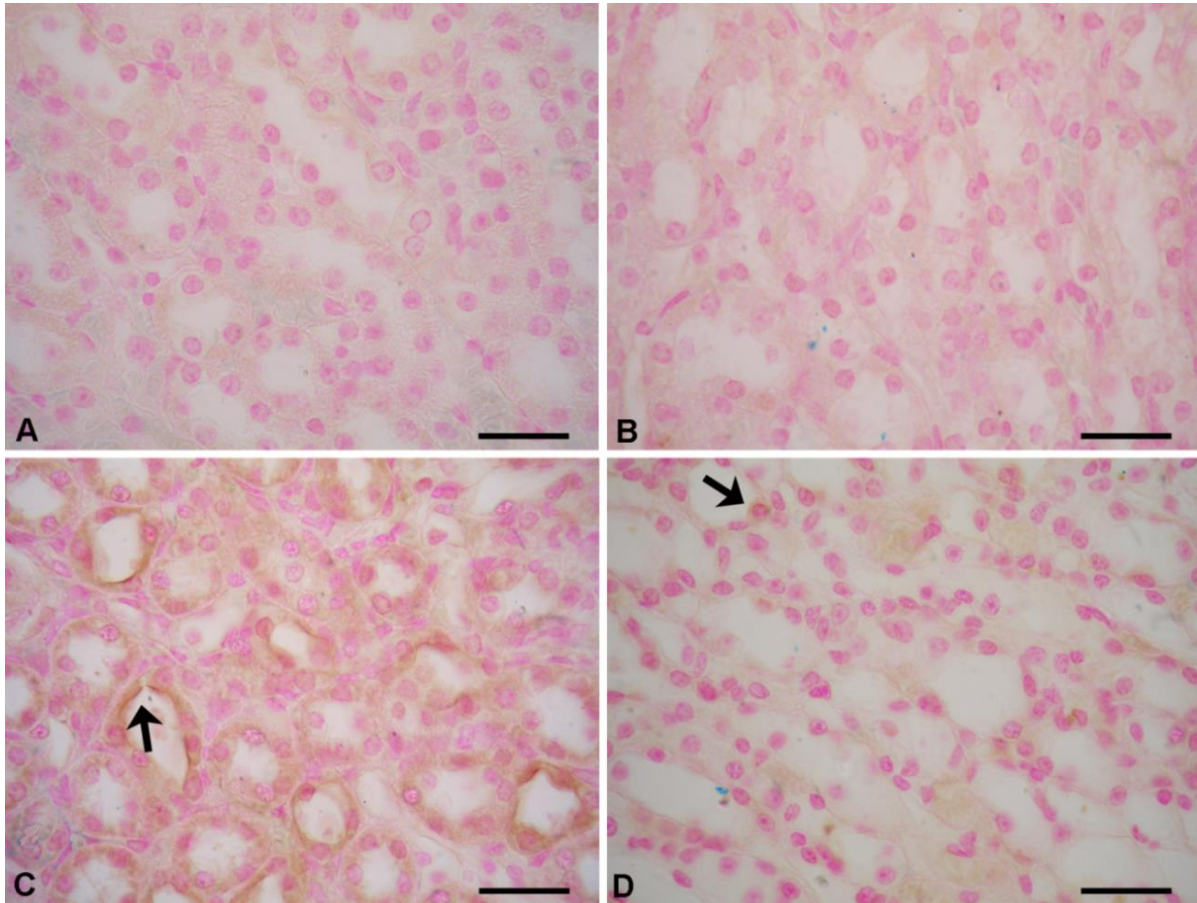


Figura 54. Inmunolocalización del RTf1 en médula renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) Ausencia de RTf1 en médula externa de ratón con adecuado hierro; **B)** Ausencia de RTf1 en médula externa de ratón con sobrecarga de hierro; **C)** RTf1 en médula interna de ratón con adecuado hierro (flecha); **D)** RTf1 en médula interna de ratón con sobrecarga de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

4.3.1.4. ZIP14 renal

En los túbulos proximales corticales identificamos la expresión de ZIP14 en adecuado hierro (Figura 55A). Cuando se analizó la expresión de este importador de hierro en los segmentos tubulares se observó inmunomarcación en la membrana apical de las células epiteliales del segmento S2 (Figura 55C). En exceso de hierro, la inmunomarcación de ZIP14 en túbulos proximales fue intensa respecto al control, observándose principalmente en la membrana apical de las células del segmento S2 y en el citoplasma en las del segmento S1 (Figuras 55B y D). En la médula externa en sobrecarga y en el control, ZIP14 se localizó en la membrana apical en las células tubulares, siendo negativa su inmunomarcación en la médula interna en ambas condiciones (Figuras 56A-D).

Resultados

La intensidad de la inmunomarcación de ZIP14 en exceso de hierro respecto al control fue confirmada por la técnica de *Western blot*, cuyos resultados mostraron un aumento significativo del nivel de este importador en el riñón en sobrecarga de hierro (Figura 57).

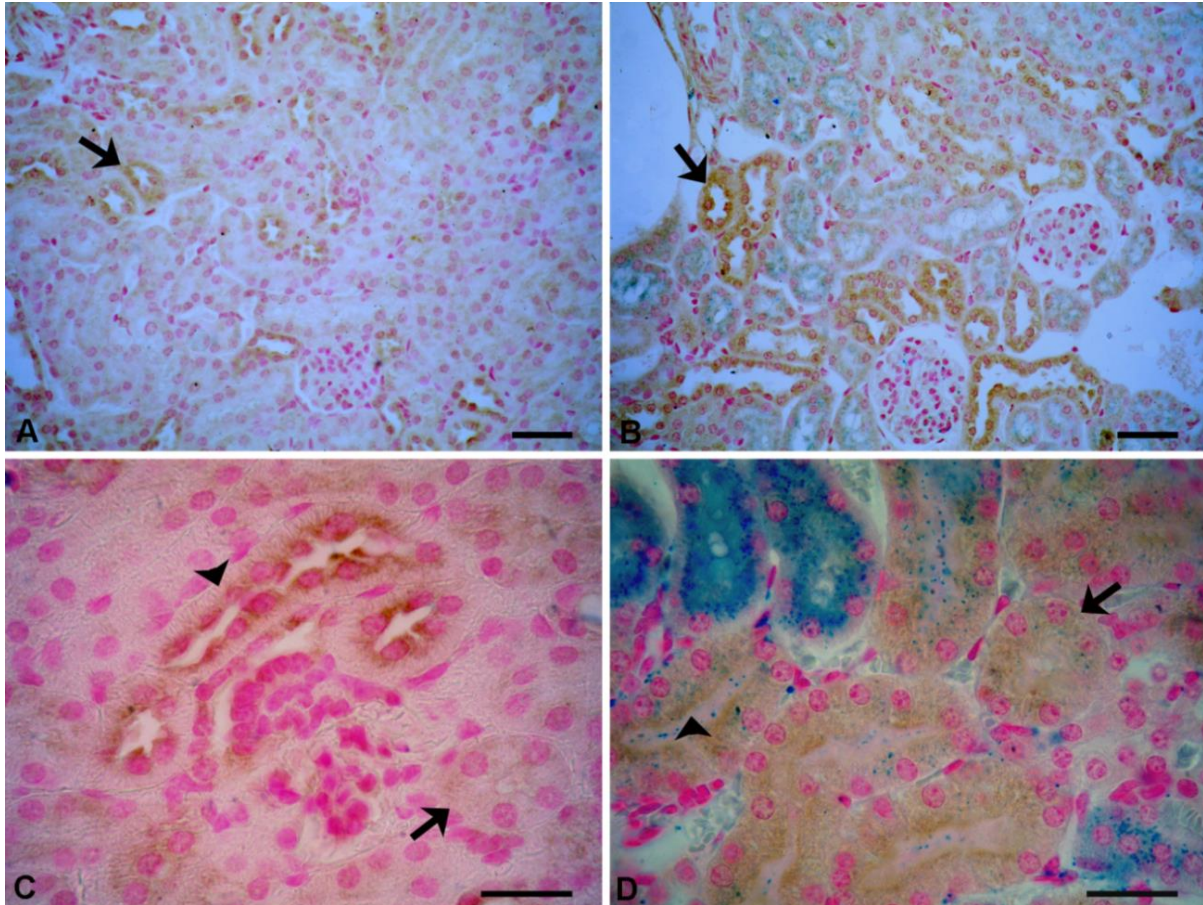


Figura 55. Inmunolocalización de ZIP14 en corteza renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) ZIP14 en corteza de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** ZIP14 en corteza de ratón con sobrecarga de hierro (Flecha); **C)** ZIP14 en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón con adecuado hierro; **D)** ZIP14 en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μm .

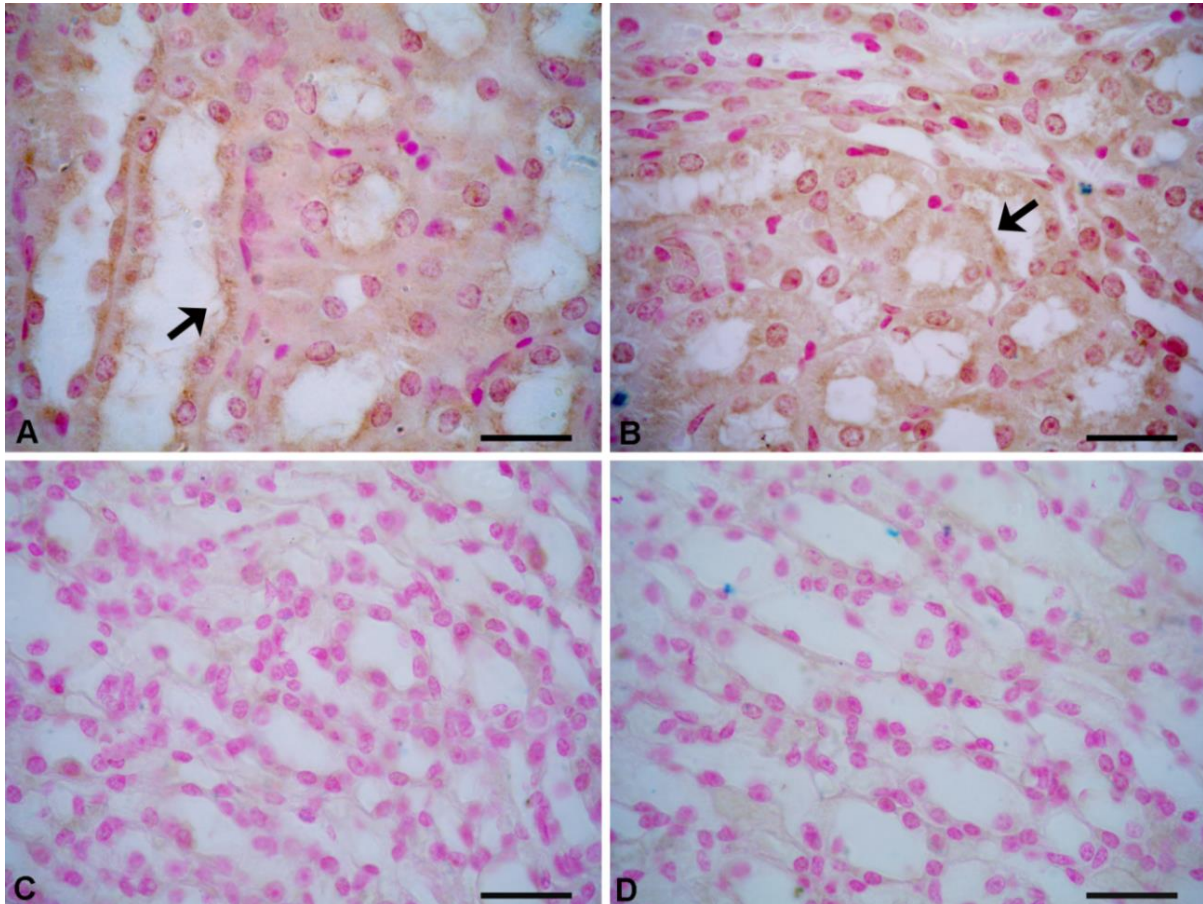


Figura 56. Inmunolocalización de ZIP14 en médula renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) ZIP14 en médula externa de ratones con adecuado hierro; **B)** ZIP14 en médula externa de ratones con sobrecarga de hierro; **C)** Ausencia de ZIP14 en médula interna de ratones con adecuado hierro; **D)** Ausencia de ZIP14 en médula interna de ratones con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

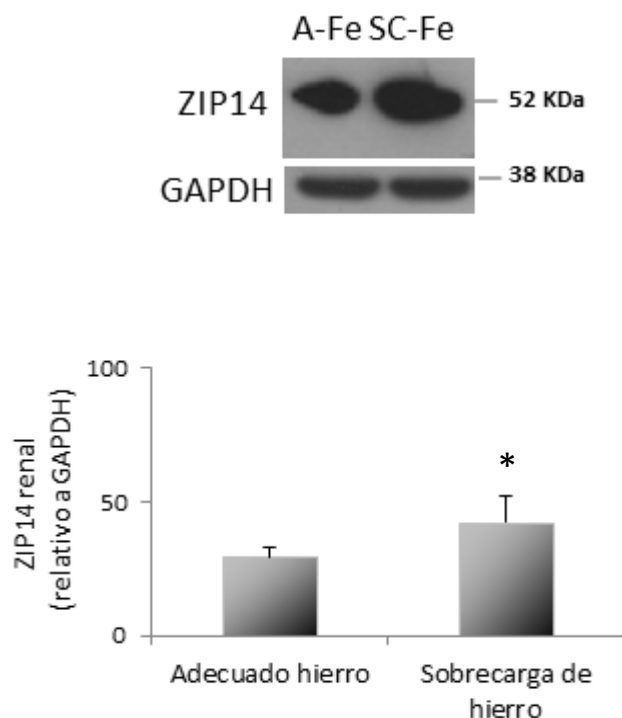


Figura 57. Western blot de ZIP14 renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. AFe: ZIP14 en riñón de ratón con adecuado hierro; SCFe: ZIP14 de riñón en ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo); * p < 0.05 sobrecarga de hierro vs. adecuado hierro.

4.3.1.5. Prohepcidina renal

En adecuado hierro la inmunomarcación de prohepcidina fue positiva en túbulo proximales (Figura 58A). El análisis de la distribución del pro-péptido de hepcidina en los segmentos tubulares mostró moderada presencia citoplasmática en las células tubulares del segmento S2 y más débil en las células de los segmentos S1 y S3 (Figuras 58C y E). Sin embargo, en exceso de hierro se observó una positividad intensa de prohepcidina, localizada en el citoplasma de las células epiteliales de los segmentos tubulares S1, S2 y S3 (Figuras 58B, D y F). El análisis de la expresión del pro-péptido en la zona medular interna mostró positividad intensa de prohepcidina en el citoplasma de células tubulares en sobrecarga de hierro respecto al estado de adecuado hierro (Figuras 59A y B).

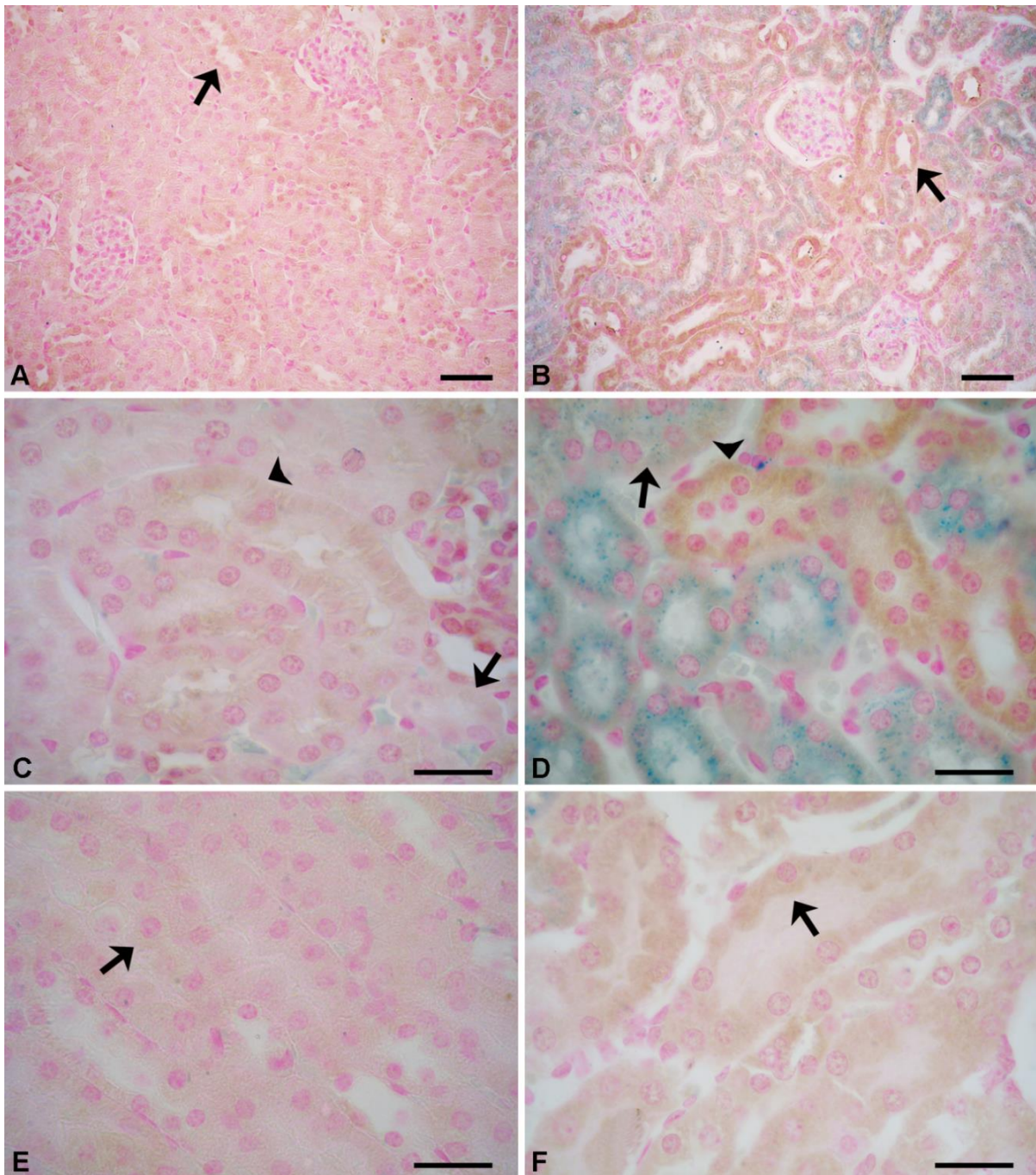


Figura 58. Inmunolocalización de prohepcidina en corteza renal en el Modelo de Sobrecarga de hierro. A) Prohepcidina en corteza de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** Prohepcidina en corteza de ratón con sobrecarga de hierro (flecha); **C)** Prohepcidina en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón con adecuado hierro; **D)** Prohepcidina en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón con sobrecarga de hierro; **E)** Prohepcidina en segmentos S3 del túbulo proximal de ratón con adecuado hierro (flecha); **F)** Prohepcidina en segmentos S3 del túbulo proximal de ratón con sobrecarga de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μm .

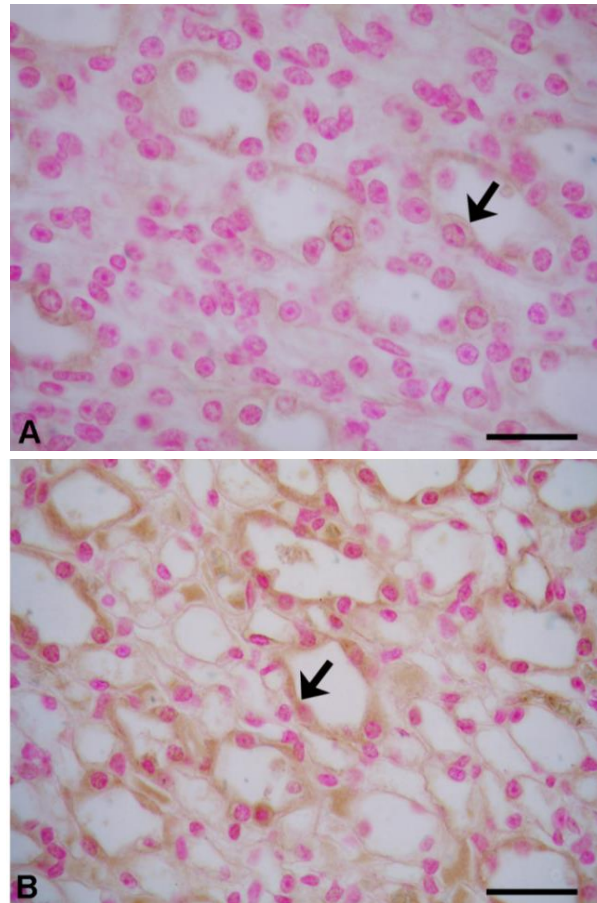


Figura 59. Inmunolocalización de prohepcidina en médula renal en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) Prohepcidina en médula interna de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** Prohepcidina en médula interna de ratón con sobrecarga de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

4.3.1.6. L-ferritina renal

Cuando estudiamos la expresión de L-ferritina en adecuado hierro observamos débil inmunomarcación en los túbulos proximales, localizada en el citoplasma de las células epiteliales tubulares del segmento S2 (Figuras 60A y C). Sin embargo, en sobrecarga de hierro se observó intensa positividad citoplasmática de L-ferritina en las células epiteliales de los segmentos S1 y S2 del túbulo proximal (Figuras 60B y D). El estudio de la zona medular renal en exceso y en adecuado hierro evidenció que la inmunomarcación de L-ferritina en médula interna y externa fue negativa (Figuras 61A-D).

Resultados

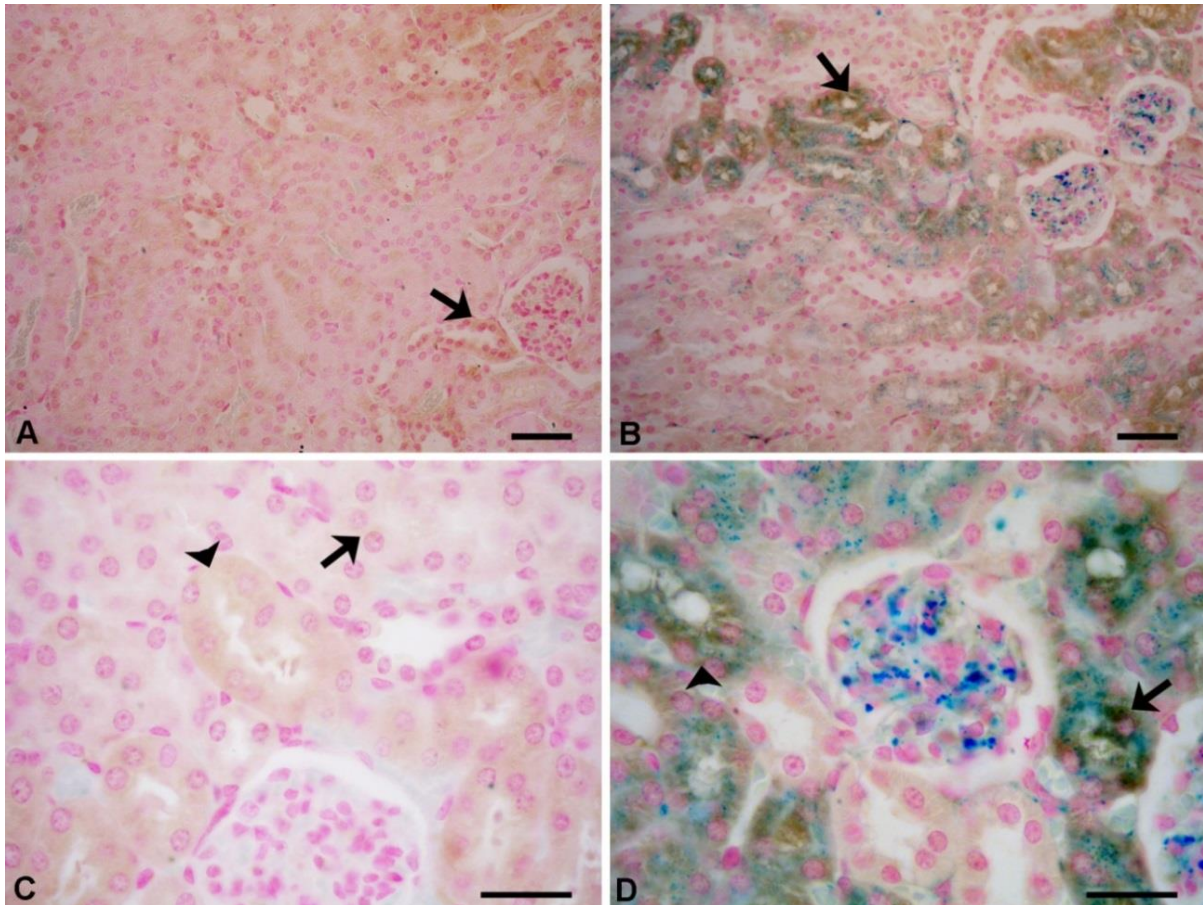


Figura 60. Inmunolocalización de L-ferritina en corteza renal en el Modelo de Sobrecarga de hierro. A) L-ferritina en corteza de ratón con adecuado hierro (flecha); B) L-ferritina en corteza de ratón con sobrecarga de hierro (flecha); C) L-ferritina en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón con adecuado hierro; D) L-ferritina en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 µm.

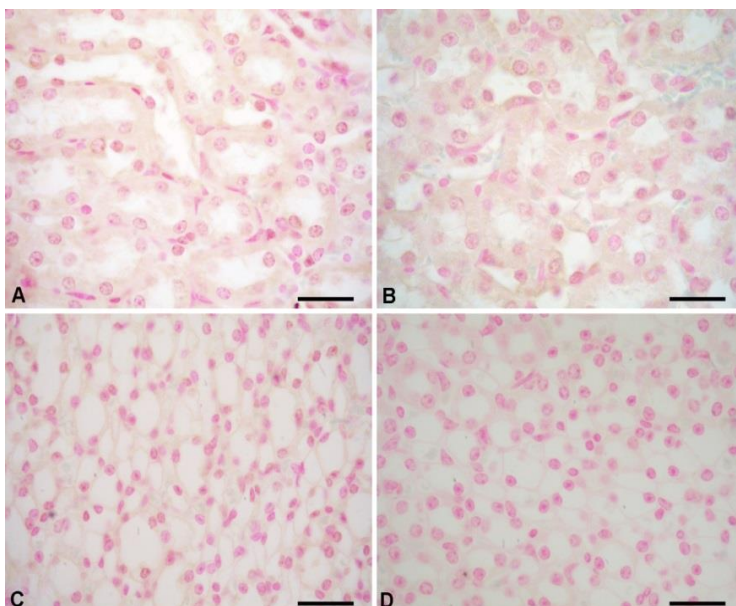


Figura 61. Inmunolocalización de L-ferritina en médula renal en el Modelo de Sobrecarga de hierro. A) Ausencia de L-ferritina en médula externa de ratón con adecuado hierro; B) Ausencia de L-ferritina en médula externa de ratón con sobrecarga de hierro; C) Ausencia de L-ferritina de ZIP14 en médula interna de ratón con adecuado hierro; D) Ausencia de L-ferritina de ZIP14 en médula interna de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 µm.

4.3.2. Modelo de Deficiencia de Hierro

Estudios previos de nuestro laboratorio sugirieron que en deficiencia de hierro el riñón podría reabsorber el hierro a través del importador DMT1 como en la anemia aguda inducida por una droga hemolítica (Veuthey et al., 2008). A partir de este hallazgo nos propusimos ampliar el conocimiento de la regulación renal del hierro en deficiencia estudiando las proteínas que regulan su movilización.

4.3.2.1. Estado del hierro renal

4.3.2.1.1. Estudio cuantitativo del hierro

En deficiencia de hierro no se observó diferencias significativas del hierro renal ($2,25 \pm 1,09 \mu\text{mol/ gr tej.}$) respecto a la condición control ($3,10 \pm 1,28 \mu\text{mol/ gr tej.}$) (Figura 62).

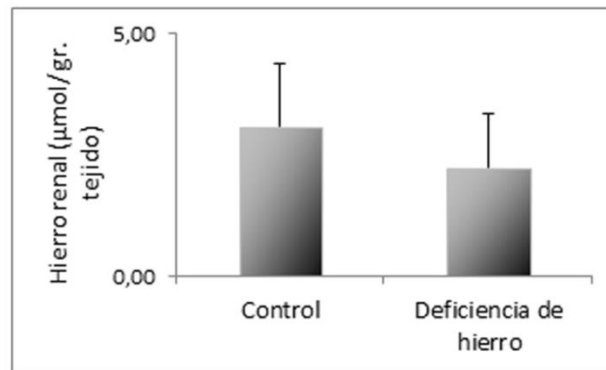


Figura 62. Hierro renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro. Ratones con deficiencia de hierro inducida por extracción de 500 μl de sangre cada 5 días durante 25 días; a ratones control se les realizó una operación simulada sin extracción sanguínea. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos (n=6/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar.

4.3.2.1.2. Estudio cualitativo del hierro

En el estado de deficiencia de hierro y en el control no se detectó hemosiderina en el tejido renal cortical y medular (Figuras 63A-F).

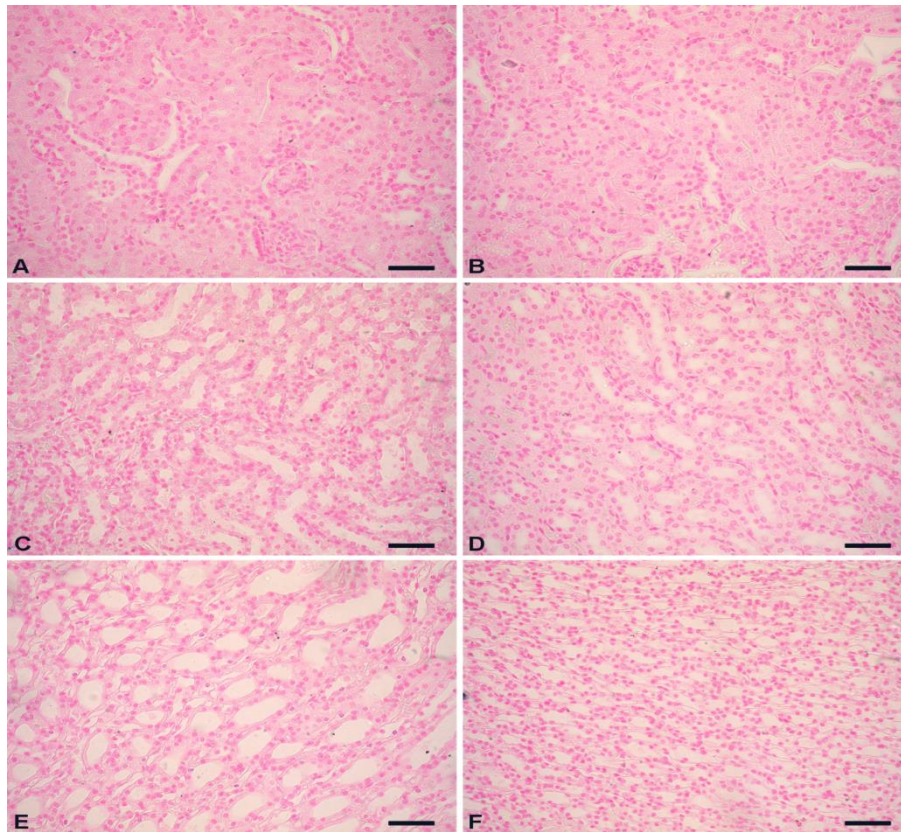


Figura 63. Hemosiderina en el tejido renal en el Modelo de Deficiencia de hierro.

A) Ausencia de hemosiderina en corteza de ratón control; **B)** Ausencia de hemosiderina en corteza de ratón con deficiencia de hierro; **C)** Ausencia de hemosiderina en médula externa de ratón control; **D)** Ausencia de hemosiderina en médula externa de ratón con deficiencia de hierro; **E)** Ausencia de hemosiderina en médula interna de ratón control; **F)** Ausencia de hemosiderina en médula interna de ratón con deficiencia de hierro. Los tejidos se procesaron para la tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

4.3.2.2. Transportador de metales divalentes 1 renal

En la condición control la inmunolocalización de DMT1 se identificó en túbulo proximales corticales (Figura 64A). El análisis de la localización tubular del importador mostró una inmunopositividad intensa en el citoplasma de las células epiteliales del segmento tubular S2 y menos pronunciada en las células epiteliales tubulares de los segmentos S1 y S3, con distribución homogénea (Figuras 64C y E). Por el contrario, en deficiencia de hierro la expresión cortical de DMT1 se identificó en el citoplasma con desplazamiento hacia la membrana apical en las células del epitelio tubular de los segmentos S2 y S3, y en las células del segmento S1 del túbulo proximal la inmunoreactividad intracelular fue homogénea (Figuras 64B, D y F). La evaluación de la zona medular mostró una inmunopositividad de DMT1 más intensa en la médula interna en

deficiencia de hierro respecto al control (Figuras 65C y D). Sin embargo, en la médula externa la expresión de DMT1 fue negativa tanto en deficiencia de hierro como en el control (Figuras 65A y B). En los controles negativos no se detectó inmunoreactividad (Figuras 66A y B).

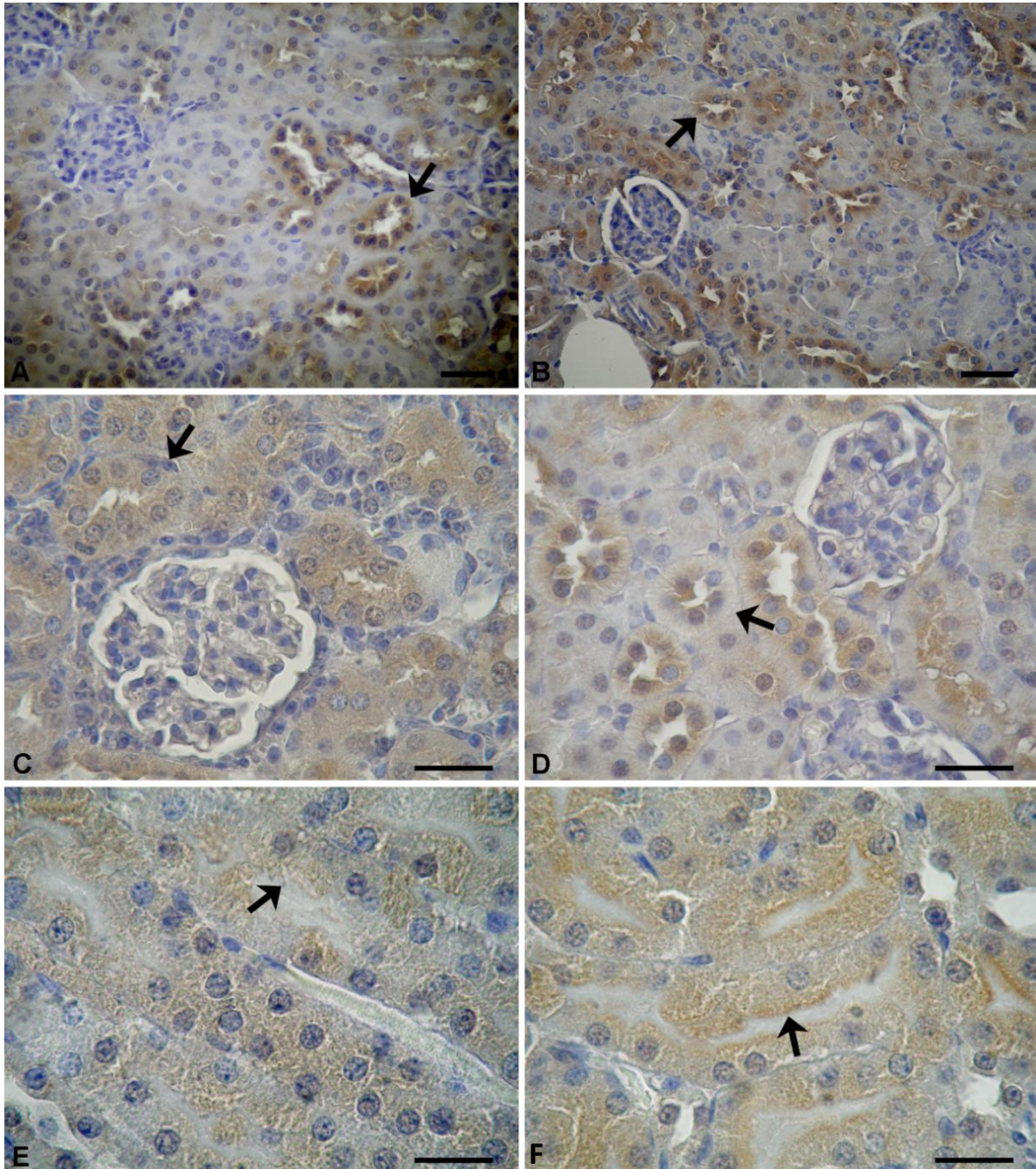


Figura 64. Inmunolocalización de DMT1 en corteza renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) DMT1 en corteza de ratón control (flecha); B) DMT1 en corteza de ratón con deficiencia de hierro (flecha); C) DMT1 en segmento S2 del túbulo proximal de ratón control (flecha); D) DMT1 en segmento S2 del túbulo proximal de ratón con deficiencia de hierro (flecha); E) DMT1 en segmentos S3 del túbulo proximal de ratón control (flecha); F) DMT1 en segmentos S3 del túbulo proximal de ratón con deficiencia de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

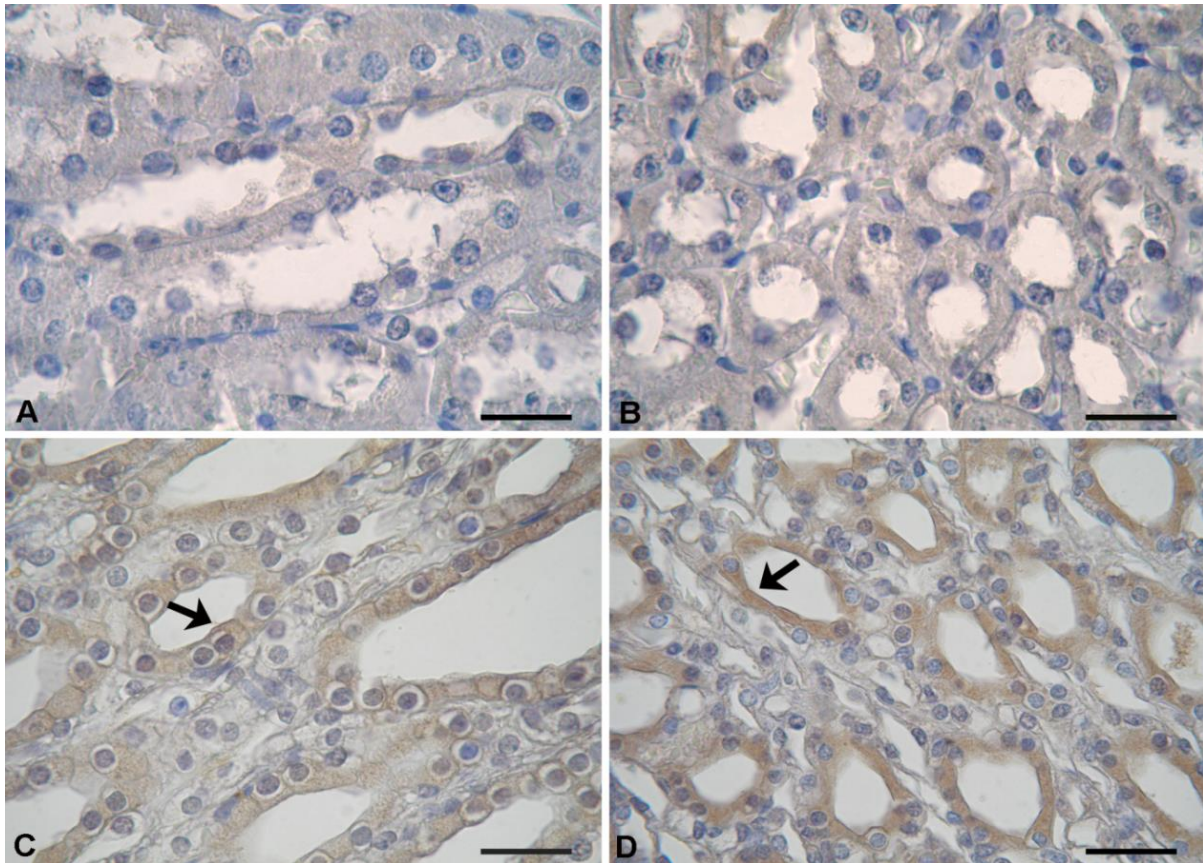


Figura 65. Inmunolocalización de DMT1 en médula renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) Ausencia de DMT1 en médula externa de ratón control; B) Ausencia de DMT1 en médula externa de ratón con deficiencia de hierro; C) DMT1 en médula interna de ratón control (flecha); D) DMT1 en médula interna de ratón con deficiencia de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

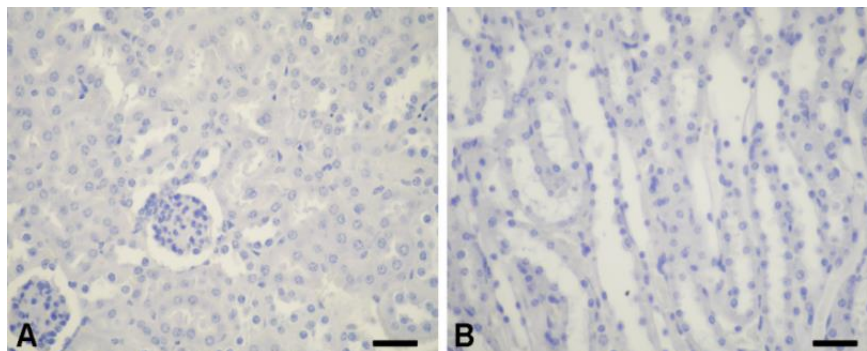


Figura 66. Control negativo del tejido renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro. Tejido renal incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario. A) Corteza renal; B) Médula renal. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 μ m.

4.3.2.3. Receptor de transferrina 1 renal

En la condición control la inmunomarcación del RTf1 fue positiva en el citoplasma de las células de los túbulos proximales, mostrando mayor intensidad en las células del segmento S2 y menor intensidad en las células de los segmentos S1 y S3 (Figuras 67A, C y E). En

Resultados

deficiencia de hierro, la inmunomarcación del RTf1 en el epitelio de los segmentos del túbulo proximal mostró mayor intensidad en la membrana apical en S2 y en el citoplasma en S1 respecto a la inmunoreactividad observada en el segmento S3 (Figuras 67B, D y F). En la médula interna, en deficiencia de hierro y en el control las células fueron inmunopositivas para el RTf1, observándose su localización en la membrana celular apical en las células tubulares (Figuras 68A y B).

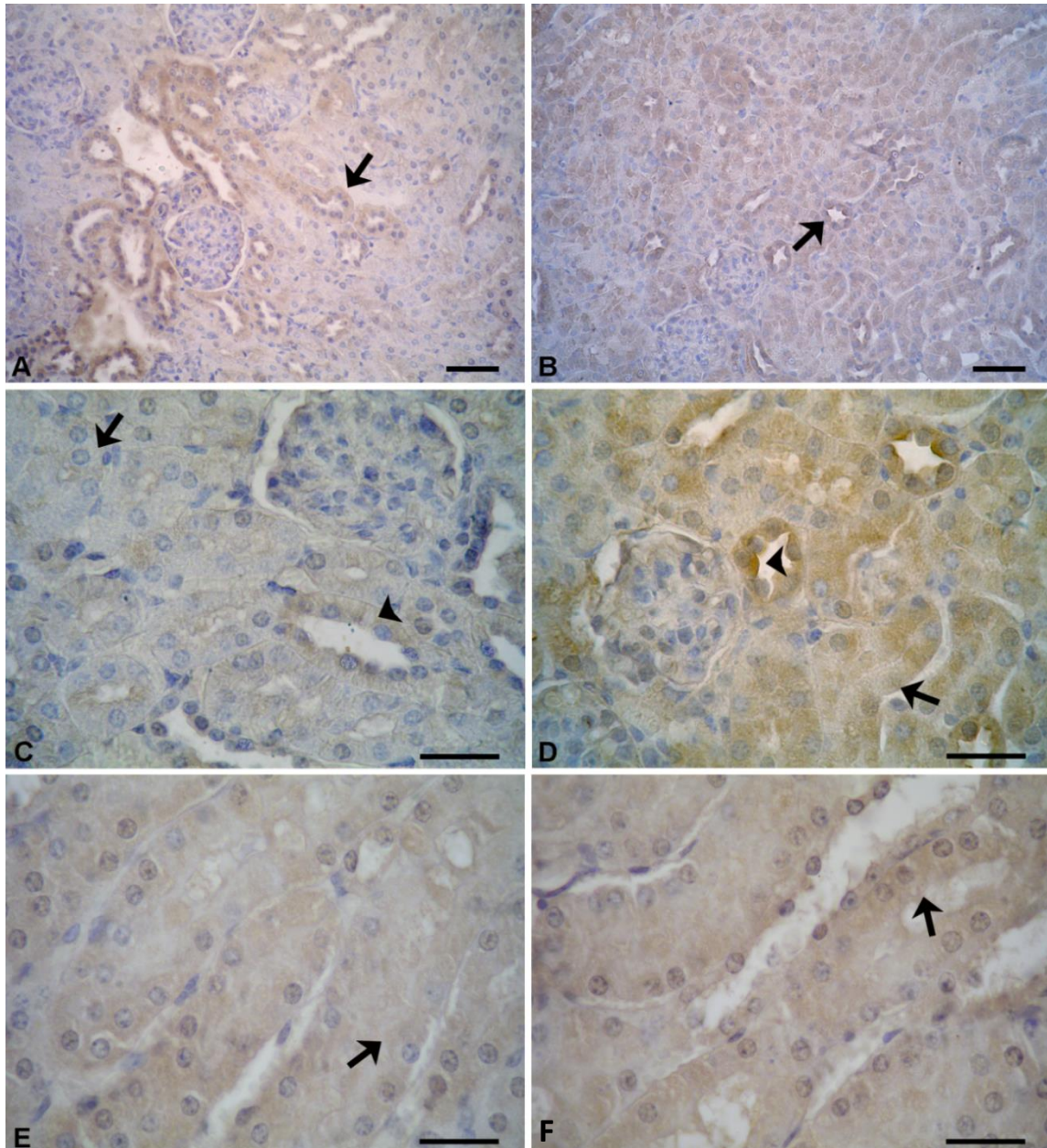


Figura 67. Inmunolocalización del RTf1 en corteza renal en el Modelo de Deficiencia de hierro. **A)** RTf1 en corteza de ratón control (flecha); **B)** RTf1 en corteza de ratón con deficiencia de hierro (flecha); **C)** RTf1 en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón control; **D)** RTf1 en segmentos S1 (flecha) y S2 (punta de flecha) del túbulo proximal de ratón con deficiencia de hierro; **E)** RTf1 en segmentos S3 del túbulo proximal de ratón control (flecha); **F)** RTf1 en segmentos S3 del túbulo proximal de ratón con deficiencia de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

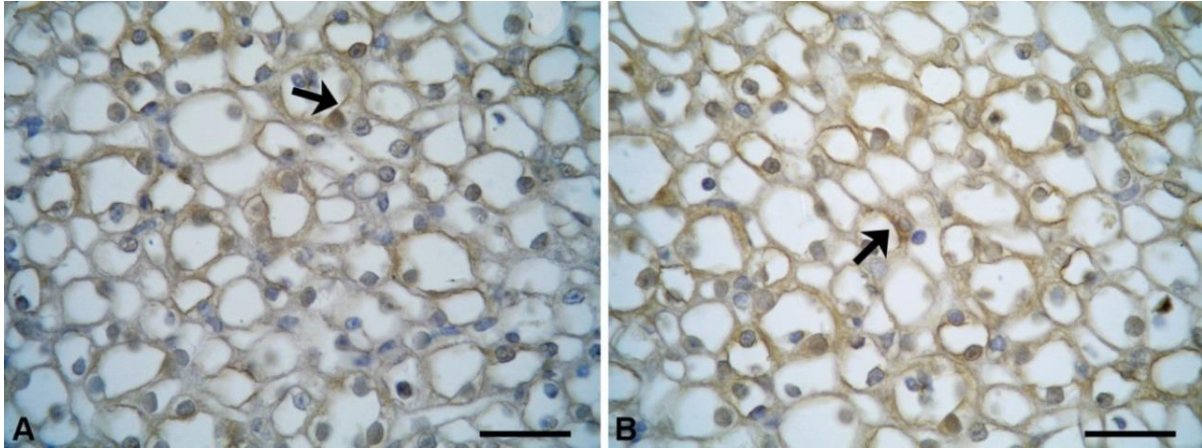


Figura 68. Inmunolocalización de RTf1 en médula renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) RTf1 en médula interna de ratón control (flecha); **D)** RTf1 en médula interna de ratón con deficiencia de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

4.3.2.4. Prohepcidina renal:

En la condición control la inmunomarcación de prohepcidina fue positiva en células del epitelio tubular proximal cortical (Figura 69A). El estudio de la expresión del pro-péptido en los segmentos tubulares mostró una inmunomarcación citoplasmática intensa en el segmento S2 respecto del segmento S1 (Figura 69C). En deficiencia de hierro, la inmunomarcación de prohepcidina en el túbulo proximal fue débil respecto de la observada en el control (Figura 69B). El análisis de la inmunomarcación del pro-péptido de hepcidina en el epitelio de los segmentos tubulares mostró una débil positividad citoplasmática en las células tubulares del segmento S2, siendo negativa la marcación en las células epiteliales del segmento S1 (Figura 69D). En la médula interna se observó que la inmunopositividad de prohepcidina en el citoplasma de las células tubulares fue menos intensa en deficiencia de hierro respecto a la condición control (Figuras 70A y B).

Resultados

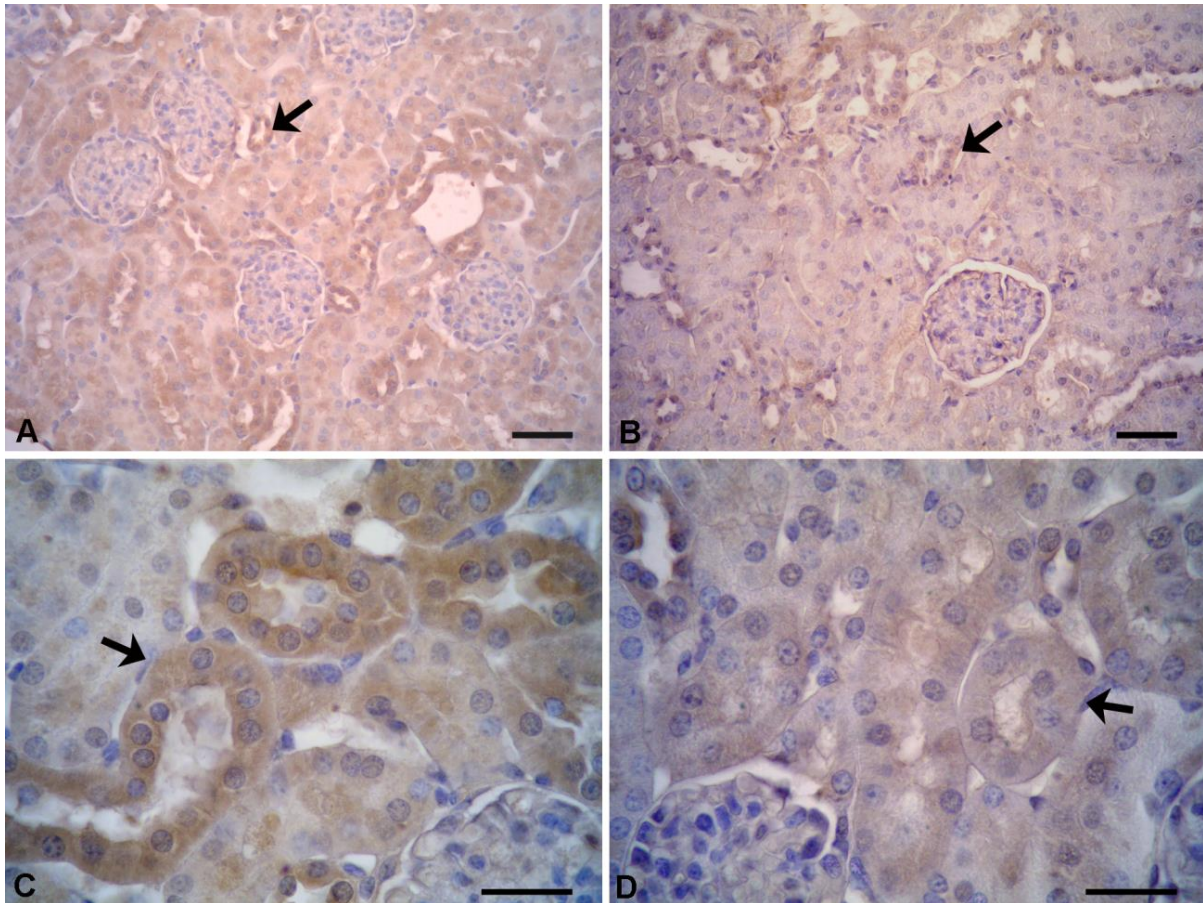


Figura 69. Inmunolocalización de prohepcidina en corteza renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) Prohepcidina en corteza de ratón control (flecha); B) Prohepcidina en corteza de ratón con deficiencia de hierro (flecha); C) Prohepcidina en el segmento S2 (flecha) del túbulo proximal de ratón control; D) Prohepcidina en el segmento S2 (flecha) del túbulo proximal de ratón con deficiencia de hierro. Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μm .

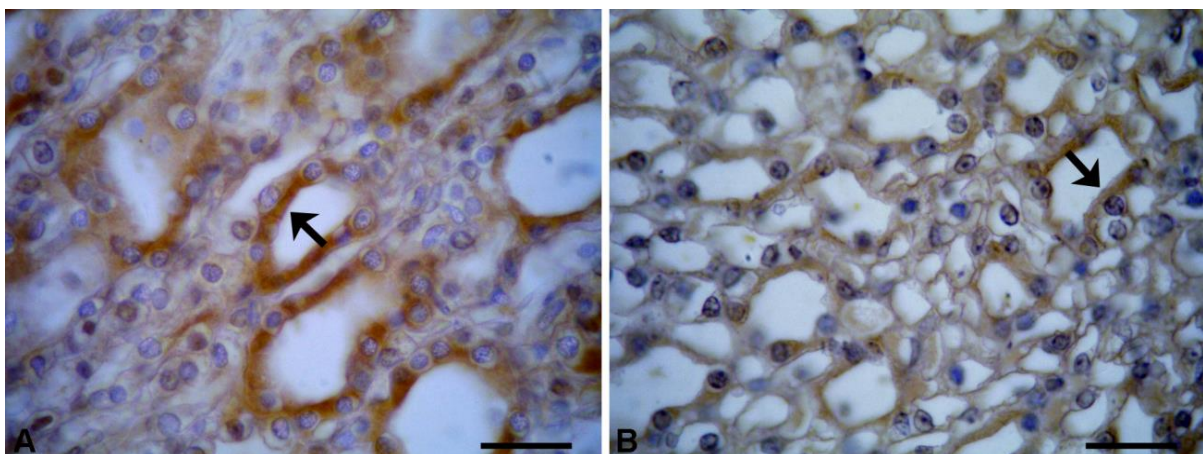


Figura 70. Inmunolocalización de RTf1 en médula renal en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) RTf1 en médula interna de ratón control (flecha); B) RTf1 en médula interna de ratón con deficiencia de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μm .

Capítulo 5

Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro.
Caracterización de las proteínas del hierro
y su regulación en pulmón

5.1. INTRODUCCIÓN

La desregulación de la homeostasis del hierro está implicada en la patogénesis de un amplio espectro de desórdenes pulmonares crónicos (Ghio, 2009). Los estudios que describen el aumento del hierro en células pulmonares y en secreciones respiratorias, se asocian generalmente a enfermedades que afectan la función pulmonar, entre las que podemos mencionar la proteinosis alveolar, la fibrosis quística y el tabaquismo (Thompson et al. 1991; Stites et al. 1999; Seymour & Presneill, 2002).

Los mecanismos que participan en la regulación de la expresión de proteínas que movilizan hierro en pulmón se conocen parcialmente. En este contexto fue que abordamos el estudio de importadores (ZIP14, DMT1 y RTf1), de reguladores (hepcidina y HFE) y del exportador FPN en modelos animales de disfunción del hierro que representan patologías relacionadas con la sobrecarga y la deficiencia de hierro.

5.2. DESCRIPCIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL PULMÓN

El aparato respiratorio está formado por las estructuras que realizan el intercambio de gases entre la atmósfera y la sangre. Los órganos que componen el sistema respiratorio son las cavidades nasales, la faringe, la laringe, la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y los pulmones.

Los pulmones son los órganos esenciales de la respiración que se sitúan en la cavidad torácica. Cada pulmón tiene la forma de un semicono, está contenido dentro de su propio saco pleural en la cavidad torácica, y está separado uno del otro por el corazón y otras estructuras del mediastino. El pulmón izquierdo está dividido en un lóbulo superior, que presenta la escotadura cardíaca en donde se sitúa el corazón, y un lóbulo inferior. El pulmón derecho está dividido en tres lóbulos: superior, medio e inferior. Los pulmones están formados principalmente por bronquiolos, alvéolos y vasos sanguíneos.

Los bronquios se dividen una y otra vez hasta que su diámetro es inferior a 1 mm, después de lo cual se conocen como bronquiolos y ya no tienen en sus paredes ni glándulas mucosas ni cartílagos. Los bronquiolos se subdividen a su vez en bronquiolos terminales.

La unidad respiratoria es la zona del pulmón que está aireada por un bronquiolo respiratorio. Los bronquiolos de mayor calibre tienen un epitelio cilíndrico simple ciliado y los de menor calibre un epitelio cúbico simple. Cuando penetran en los lobulillos del

pulmón, se dividen en bronquiolos terminales y bronquiolos respiratorios. Los bronquiolos respiratorios se continúan con los conductos alveolares y, estos, con los sacos alveolares que contienen estructuras pequeñas llamadas alvéolos pulmonares (Figura 71). En los alvéolos del pulmón se lleva a cabo el intercambio de oxígeno y de dióxido de carbono, proceso que se denomina hematosis.

La pared de los alvéolos se reduce a una delgada membrana de 4 micras de grosor. Uno de sus lados contacta con el aire que llega de los bronquiolos y el otro se relaciona con la red capilar, donde los glóbulos rojos realizan la hematosis. En los alveolos se observan principalmente dos tipos de células unidas entre sí por uniones ocluyentes, los neumonocitos tipo I y tipo II. En la zona alveolar también se observan macrófagos alveolares, que son células que pertenecen al sistema fagocitario mononuclear del aparato inmunológico, cuya función es fagocitar partículas extrañas que ingresan con el aire, como el polvo (Figura 71).

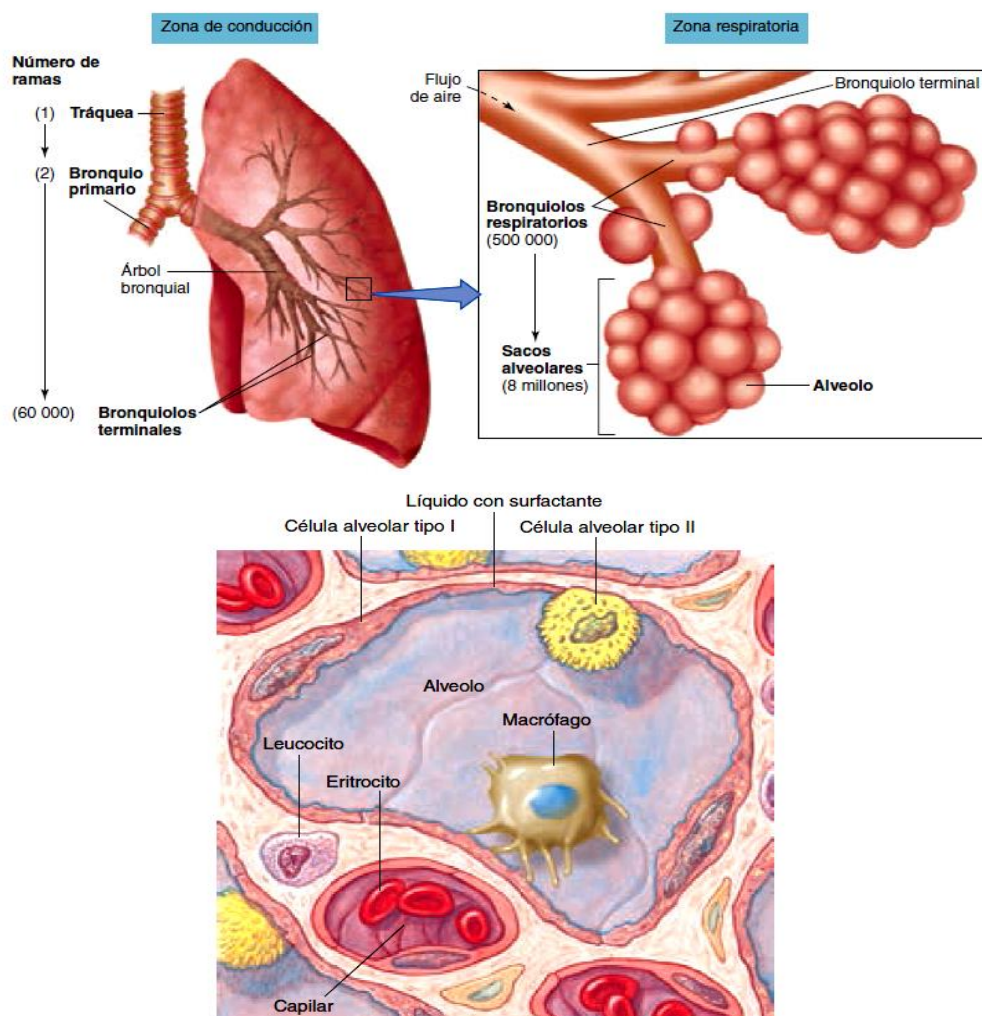


Figura 71. Diagrama esquemático del pulmón.
Stuart Ira Fox. Fisiología Humana. 12ª edición (2011).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Modelo de Sobrecarga de Hierro

5.3.1.1. Estado del hierro pulmonar

5.3.1.1.1. Estudio cuantitativo del hierro

En sobrecarga de hierro se observó un aumento significativo del hierro pulmonar ($106,8 \pm 30,3 \mu\text{mol/ gr tej.}$) respecto a la condición control (adecuado hierro) ($0,6 \pm 0,1 \mu\text{mol/ gr tej.}$) (Figura 72).

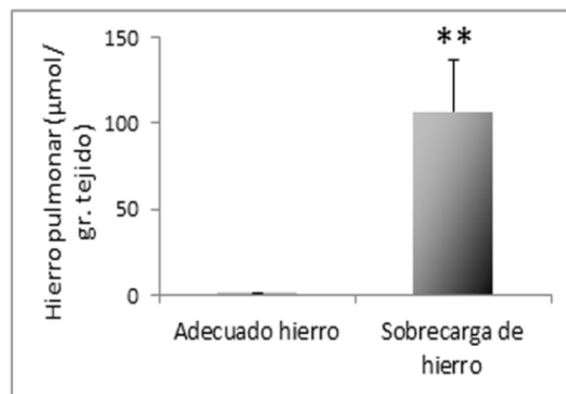


Figura 72. Hierro pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. Ratones con sobrecarga de hierro inducida por la administración Hierro-Sacarato los días 0, 5, 10 y 15 del protocolo experimental (dosis total= 1,3 g/Kg peso); a ratones con adecuado hierro (control) se les administró Solución Fisiológica. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos ($n=6/\text{grupo}$). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; ** $p < 0.01$ sobrecarga de hierro vs. adecuado hierro.

5.3.1.1.2. Estudio cualitativo del hierro

En sobrecarga de hierro se detectó abundante depósito de hemosiderina en macrófagos alveolares identificados según su morfología (Figura 73D). En adecuado hierro (control) no se detectó presencia de hemosiderina en el tejido pulmonar (Figuras 73A y C).

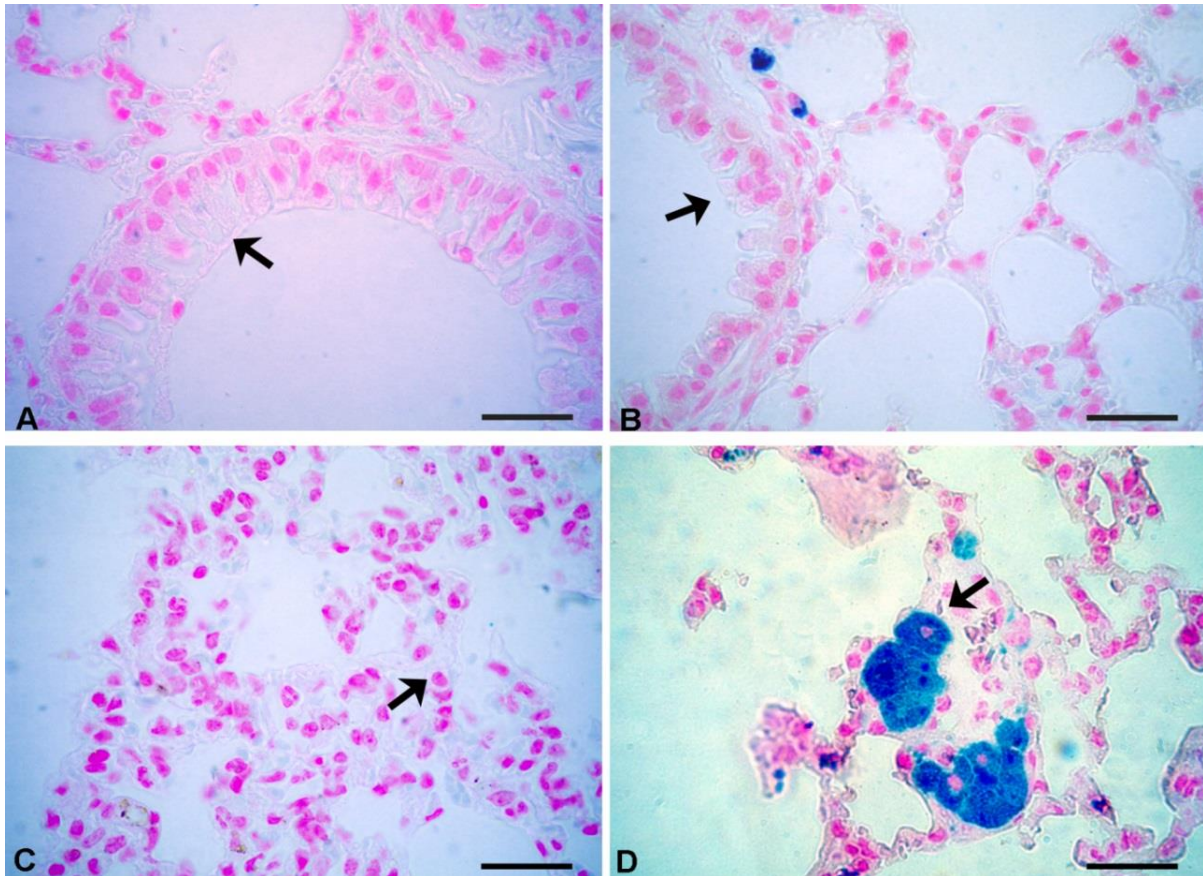


Figura 73. Hemosiderina en pulmón en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) Ausencia de hemosiderina en células bronquiales de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** Ausencia de hemosiderina en células bronquiales de ratón con sobrecarga de hierro (flecha); **C)** Ausencia de hemosiderina en macrófagos alveolares de ratón con adecuado hierro (flecha); **D)** Hemosiderina en macrófagos alveolares de ratón con sobrecarga de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para la tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

5.3.1.2. Transportador ZIP14 pulmonar

En adecuado hierro se identificó la inmunolocalización del transportador ZIP14 en el citoplasma de las células bronquiales (Figura 74A). En exceso de hierro se observó mayor inmunoposividad de ZIP14 en el citoplasma de las células bronquiales respecto al estado de adecuado hierro (Figura 74B). En los controles negativos no se detectó inmunoreactividad (Figura 75A).

Por *Western blot* confirmamos que la expresión pulmonar de ZIP14 aumentó significativamente en exceso de hierro respecto al estado de adecuado hierro (Figura 76).

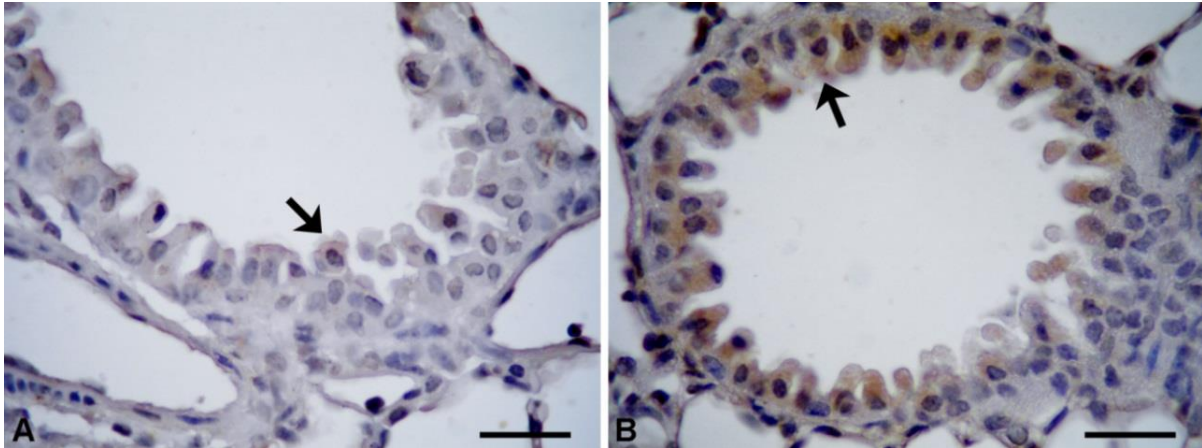


Figura 74. Inmunolocalización de ZIP14 en pulmón en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) ZIP14 en células bronquiales de ratón con adecuado hierro (flecha); B) ZIP14 en células bronquiales de ratón con sobrecarga de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

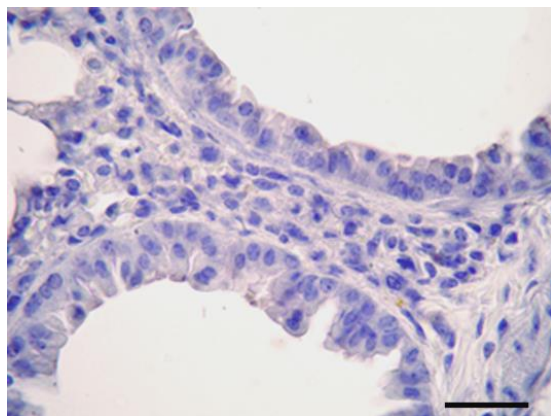


Figura 75. Control negativo del tejido pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. Tejido pulmonar incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario contrastado con hematoxilina. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 μ m.

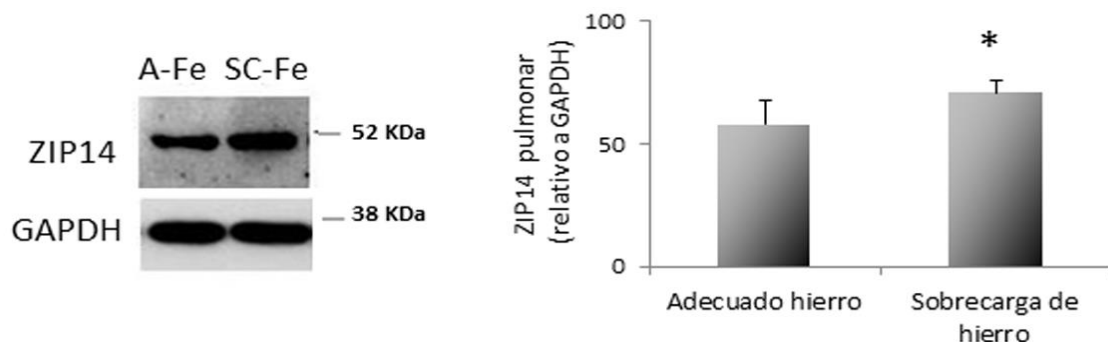


Figura 76. Western blot de ZIP14 pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. AFe: ZIP14 en pulmón de ratón con adecuado hierro; SCFe: ZIP14 en pulmón de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; * $p < 0.05$ sobrecarga de hierro vs. adecuado hierro.

5.3.1.3. Transportador de metales divalentes 1 pulmonar

La inmunolocalización de DMT1 en adecuado hierro se identificó en el citoplasma de las células bronquiales (Figura 77A). En sobrecarga de hierro, la expresión de DMT1 se inmunolocalizó en la membrana apical de las células bronquiales (Figura 77B). En macrófagos alveolares se observó que la inmunomarcación citoplasmática de DMT1 fue similar en deficiencia de hierro y en el control (Figuras 77C y D). Los controles negativos no mostraron inmunoreactividad (Figuras 78A-D).

Los estudios de *Western blot* mostraron que el nivel de DMT1 pulmonar no cambió en sobrecarga de hierro respecto al estado de adecuado hierro (Figura 79).

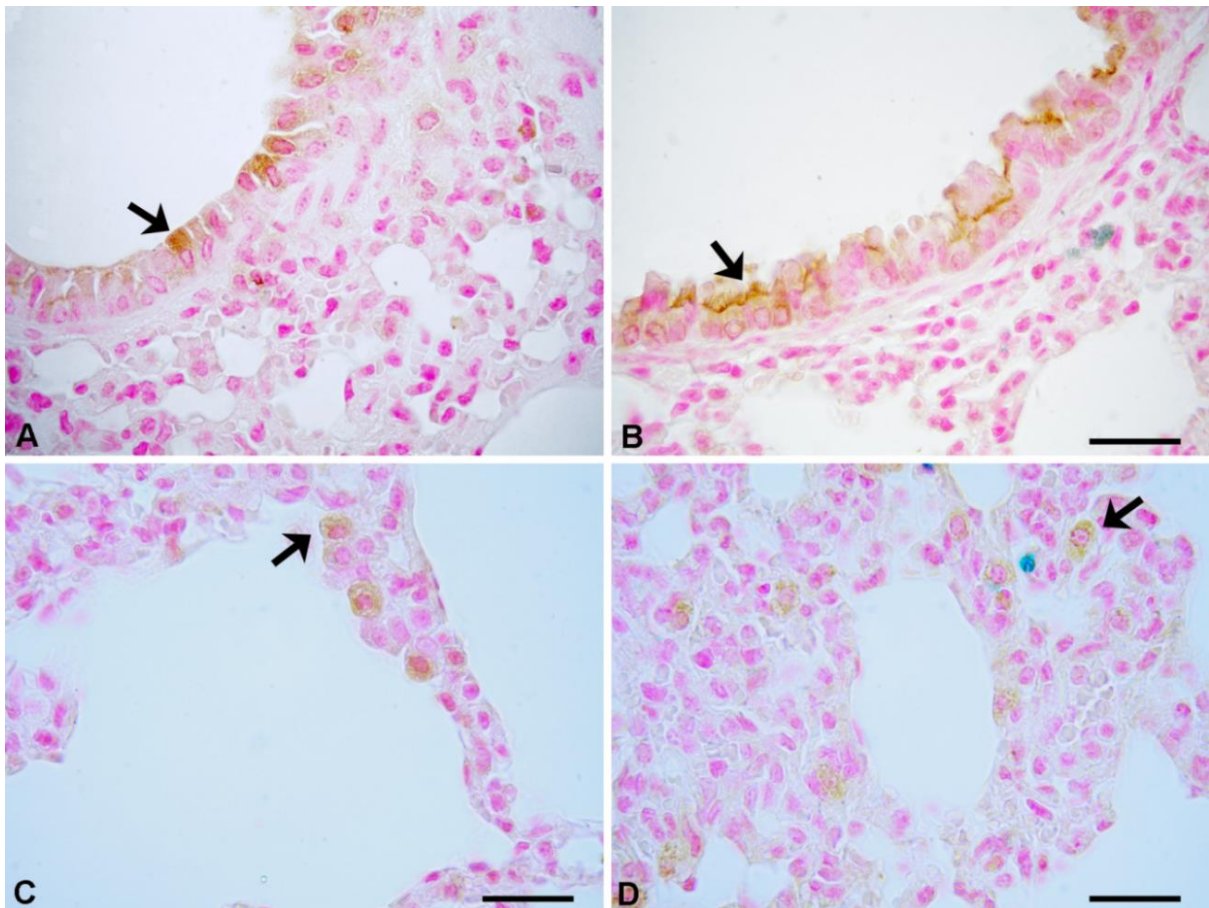


Figura 77. Inmunolocalización de DMT1 en pulmón en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) DMT1 en células bronquiales de ratón con adecuado hierro (flecha); B) DMT1 en células bronquiales de ratón con sobrecarga de hierro (flecha); C) DMT1 en macrófagos alveolares de ratón con adecuado hierro (flecha); D) DMT1 en macrófagos alveolares de ratón con sobrecarga de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

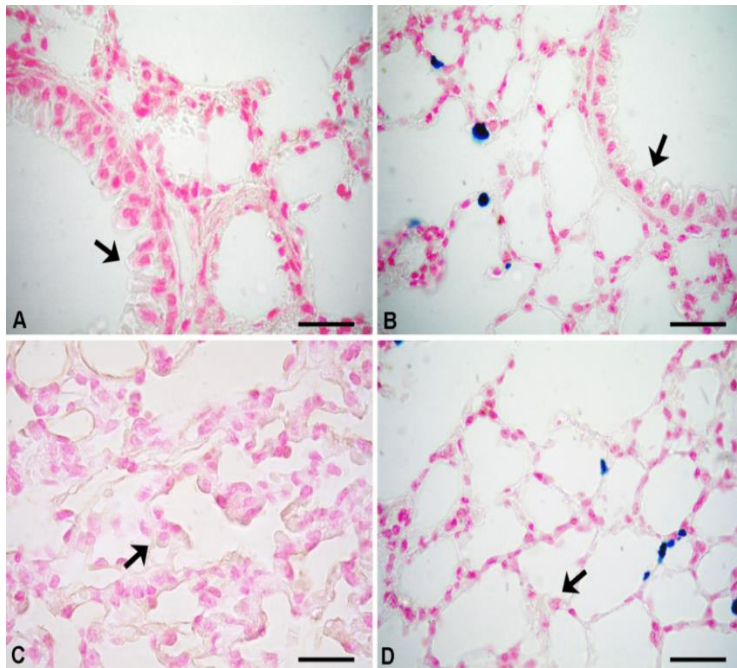


Figura 78. Control negativo del tejido pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de hierro. Tejido pulmonar incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario seguido de la Tinción de Perl's en ratón con adecuado hierro; **A)** Zona bronquial de ratón con adecuado hierro; **B)** Zona bronquial de ratón con sobrecarga de hierro; **C)** Zona alveolar de ratón con adecuado hierro; **D)** Zona alveolar de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 μm .

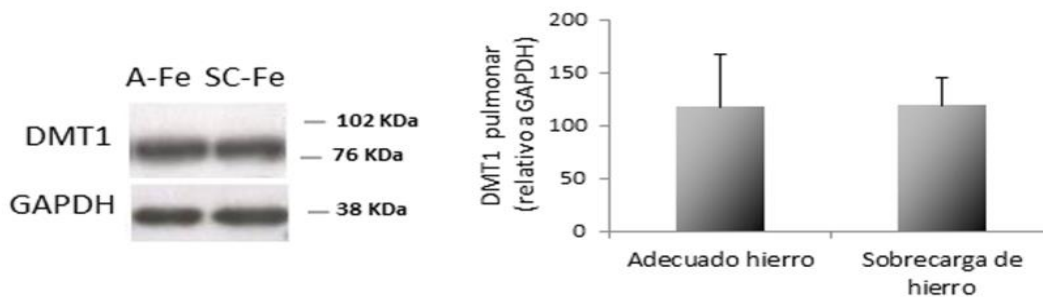


Figura 79. Western blot de DMT1 pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. AFe: DMT1 en pulmón de ratón con adecuado hierro; SCFe: DMT1 en pulmón de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar.

5.3.1.4. Receptor de transferrina 1 pulmonar

Mediante la técnica de *Western blot* no se detectaron cambios en el nivel proteico pulmonar del RTf1 en sobrecarga de hierro respecto al estado de adecuado hierro (Figura 80).

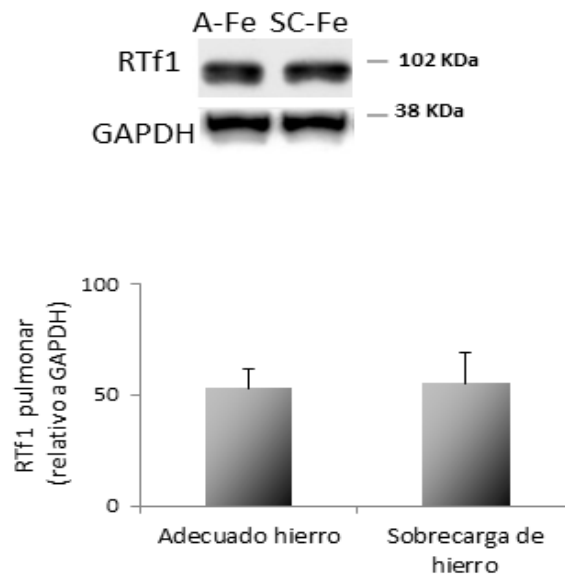


Figura 80. Western blot de RTf1 pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. AFe: RTf1 en pulmón de ratón con adecuado hierro; SCFe: RTf1 en pulmón de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar.

5.3.1.5. Ferroportina pulmonar

La inmunomarcación del exportador de hierro ferroportina (FPN) se identificó en el citoplasma de las células bronquiales en la condición de adecuado hierro (Figuras 81A). En exceso de hierro la positividad citoplasmática de FPN fue mayor respecto a la observada en adecuado hierro (Figuras 81A y B). En macrófagos alveolares, la expresión de FPN fue similar en sobrecarga y en adecuado hierro (Figuras 81C y D).

Por la técnica de *Western blot* confirmamos que la expresión de FPN en pulmón aumentó significativamente en exceso de hierro respecto al control (adecuado hierro) (Figura 82).

Resultados

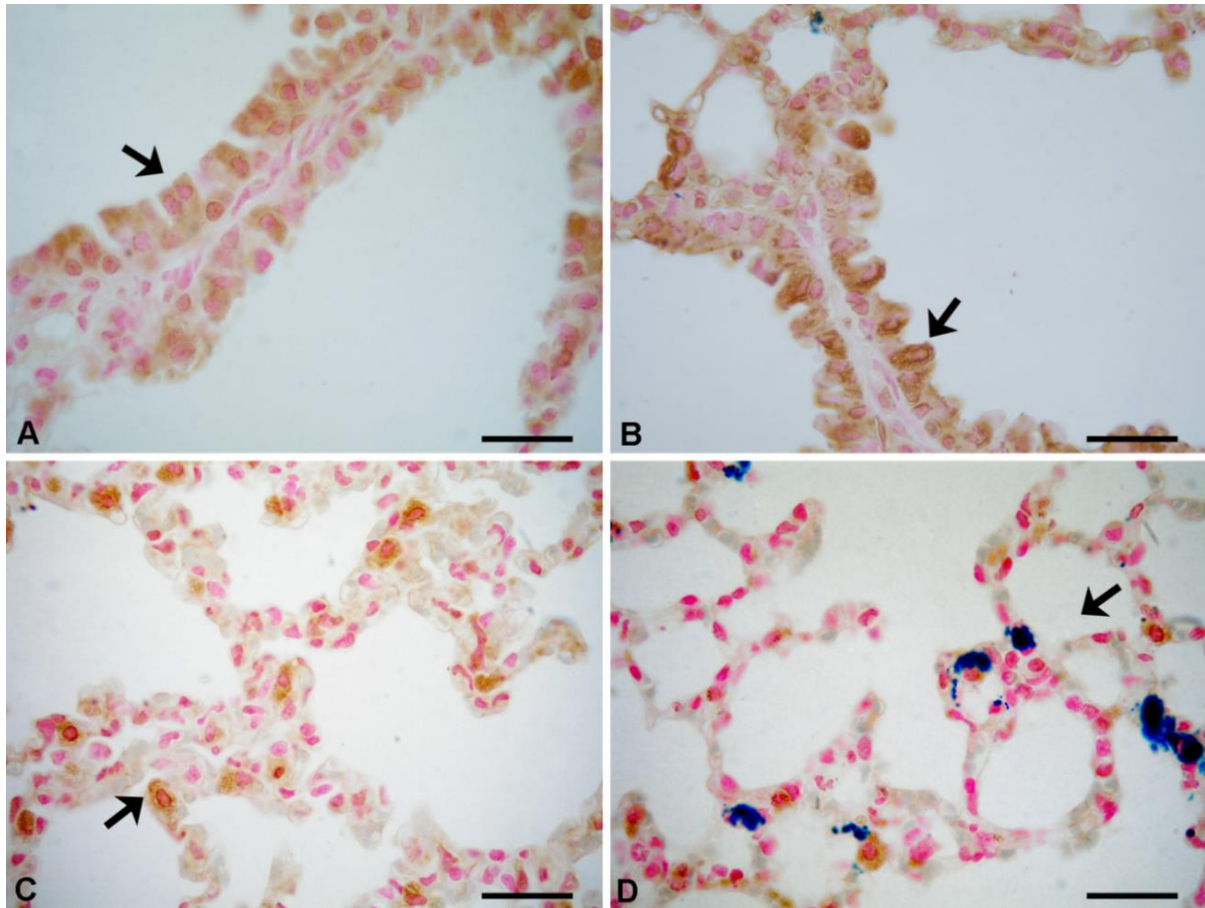


Figura 81. Inmunolocalización de FPN en pulmón en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) FPN en células bronquiales de ratón con adecuado hierro (flecha); B) FPN en células bronquiales de ratón con sobrecarga de hierro (flecha); C) FPN en macrófagos alveolares de ratón con adecuado hierro (flecha); D) FPN en macrófagos alveolares de ratón con sobrecarga de hierro (flecha) Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μm .

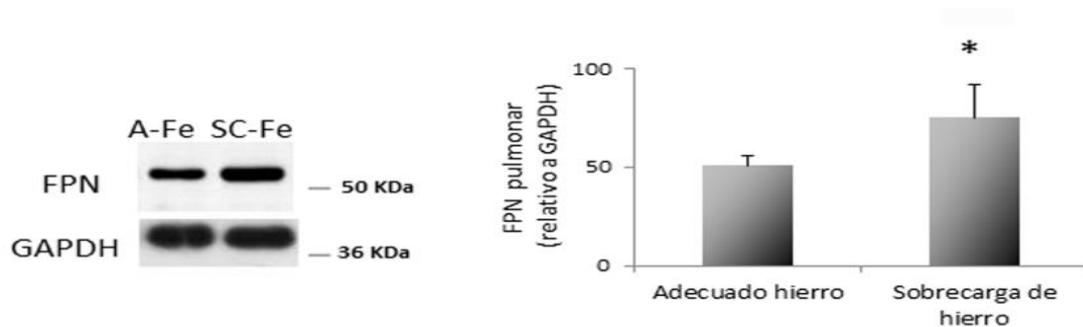


Figura 82. Western blot de FPN pulmonar en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. AFe: FPN en pulmón de ratón con adecuado hierro; SCFe: FPN en pulmón de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; * $p < 0.05$ sobrecarga de hierro vs. adecuado hierro.

5.3.1.6. Prohepcidina pulmonar

La inmunomarcación de prohepcidina se identificó en el citoplasma de las células bronquiales y de los macrófagos alveolares tanto en sobrecarga de hierro como en adecuado hierro (Figuras 83A y B).

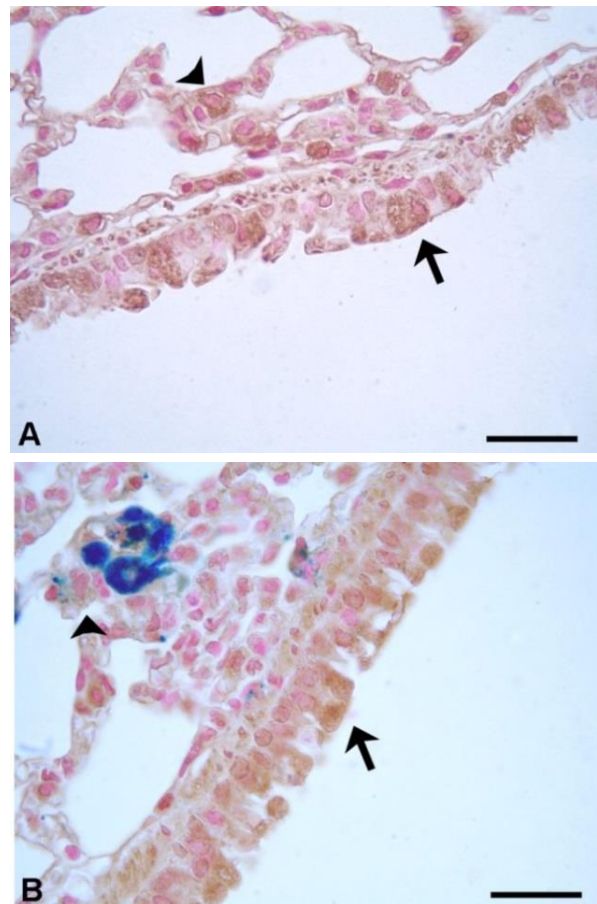


Figura 83. Inmunolocalización de prohepcidina en pulmón en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) Prohepcidina en células bronquiales (flecha) y en macrófagos alveolares (punta de flecha) de ratón con adecuado hierro; **B)** Prohepcidina en células bronquiales (flecha) y en macrófagos alveolares (punta de flecha) de ratón con sobrecarga de hierro. Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

5.3.1.7. L-ferritina pulmonar

En adecuado hierro (control), la inmunolocalización de L-ferritina se identificó en el citoplasma de las células bronquiales con una distribución homogénea (Figura 84A). Sin embargo, en sobrecarga de hierro L-ferritina se localizó en el citoplasma celular con desplazamiento hacia la membrana apical (Figura 84B). En macrófagos alveolares, la

inmunoreactividad de L-ferritina fue intensa en exceso de hierro respecto al estado de adecuado hierro (Figuras 84C y D).

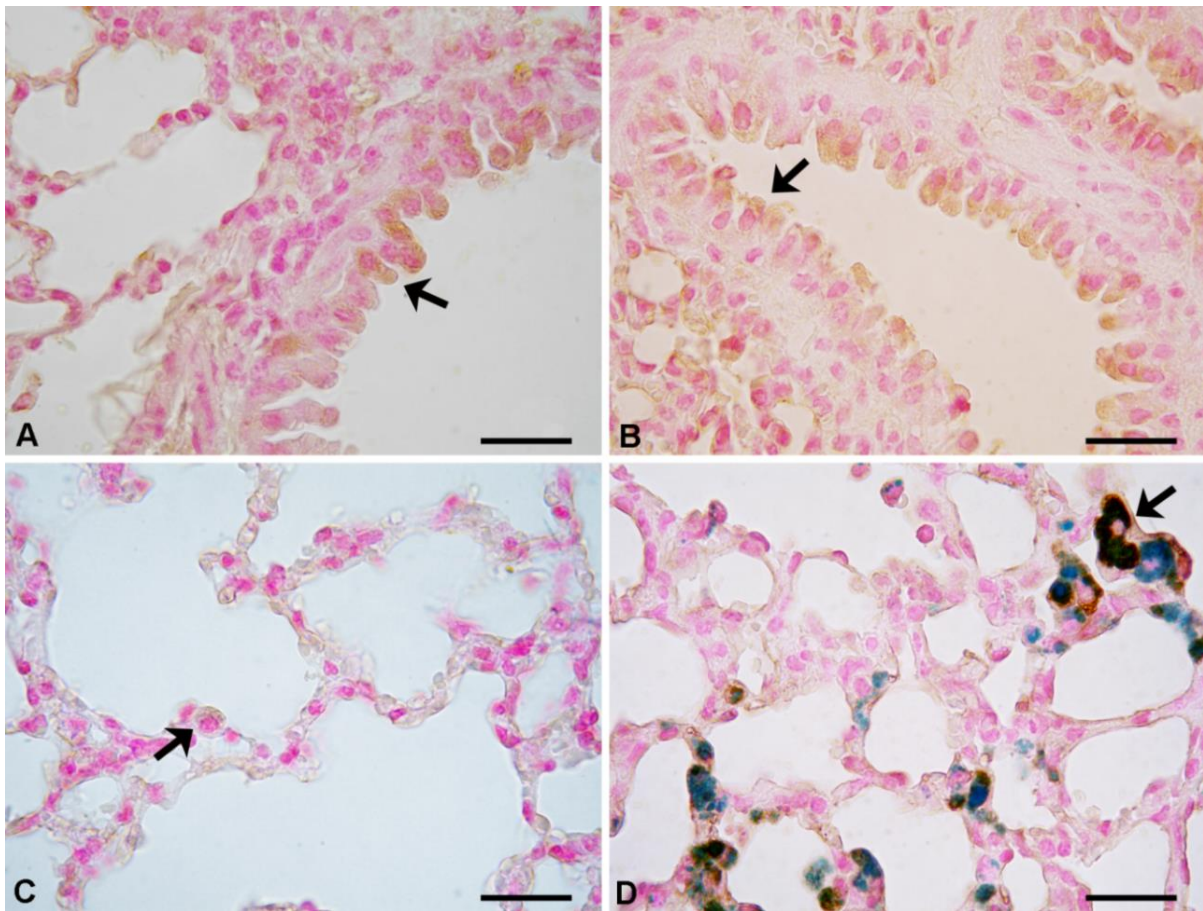


Figura 84. Inmunolocalización de L-ferritina en pulmón en el Modelo de Sobrecarga de Hierro. A) L-ferritina en células bronquiales de ratón con adecuado hierro (flecha); **B)** L-ferritina en células bronquiales de ratón con sobrecarga de hierro (flecha); **C)** L-ferritina en macrófagos alveolares de ratón con adecuado hierro (flecha); **D)** L-ferritina en macrófagos alveolares de ratón con sobrecarga de hierro (flecha) Los tejidos se procesaron para la técnica de doble tinción según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μm .

5.3.2. Modelo de Deficiencia de hierro

5.3.2.1. Estado del hierro:

5.3.2.1.1. Estudio cuantitativo del hierro

En deficiencia de hierro no se observaron cambios significativos del hierro pulmonar ($0,13 \pm 0,03 \mu\text{mol/ gr tej.}$) respecto a la condición control ($0,11 \pm 0,02 \mu\text{mol/ gr tej.}$) (Figura 85).

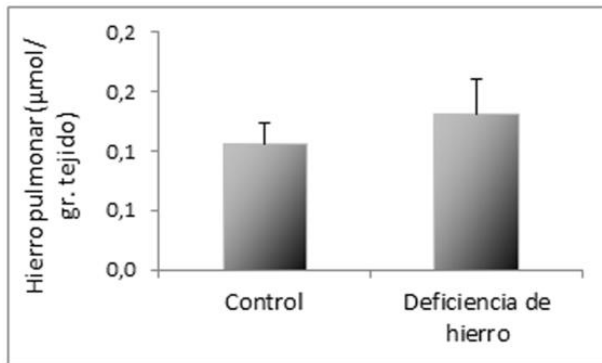


Figura 85. Hierro pulmonar en el Modelo de Deficiencia de Hierro. R ratones con deficiencia de hierro inducida por extracción de 500 µl de sangre cada 5 días durante 25 días; a ratones control se les realizó una operación simulada sin extracción sanguínea. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos (n=6/grupo). Los datos se expresan como la media ± desvío estándar.

5.3.2.1.2. Estudio cualitativo del hierro

La evaluación de hemosiderina mediante la tinción de Perl's no mostró presencia del pigmento en el tejido pulmonar en deficiencia de hierro y en el control (Figuras 86A-D).

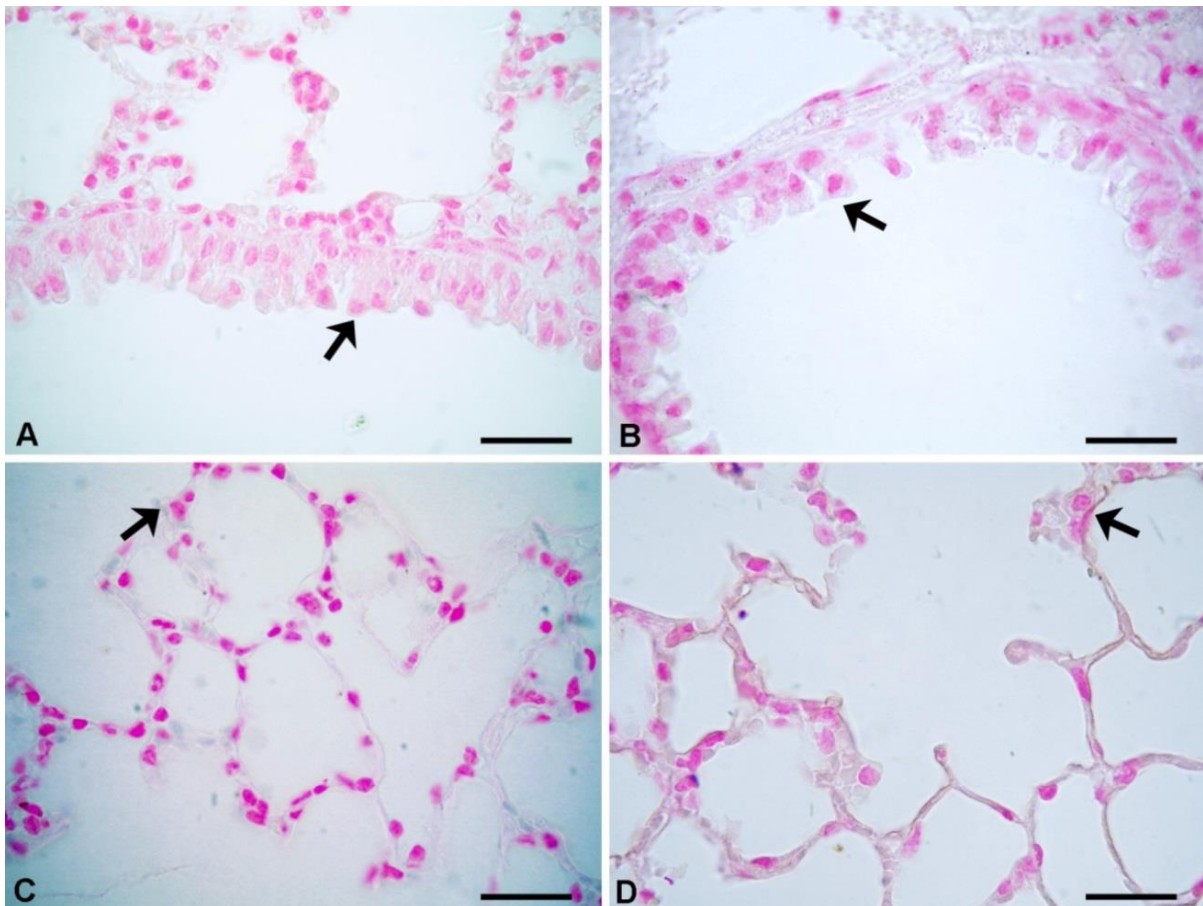


Figura 86. Hemosiderina en pulmón en el Modelo de Deficiencia de hierro. **A)** Ausencia de hemosiderina en células bronquiales de ratón control (flecha); **B)** Ausencia de hemosiderina en células bronquiales de ratón con deficiencia de hierro (flecha); **C)** Ausencia de hemosiderina en macrófagos alveolares de ratón control (flecha); **D)** Ausencia de hemosiderina en macrófagos alveolares de ratón con deficiencia de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para la tinción de Perl's según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 µm.

5.3.2.2. Transportador ZIP14 pulmonar

La inmunomarcación de ZIP14 identificada en el citoplasma de las células bronquiales fue menos positiva en deficiencia de hierro respecto a la condición control (Figuras 87A y B). En los controles no se detectó inmunoreactividad (Figuras 88A y B).

Por *Western blot* confirmamos que la expresión de ZIP14 pulmonar disminuyó significativamente en deficiencia de hierro respecto al control (Figura 89).

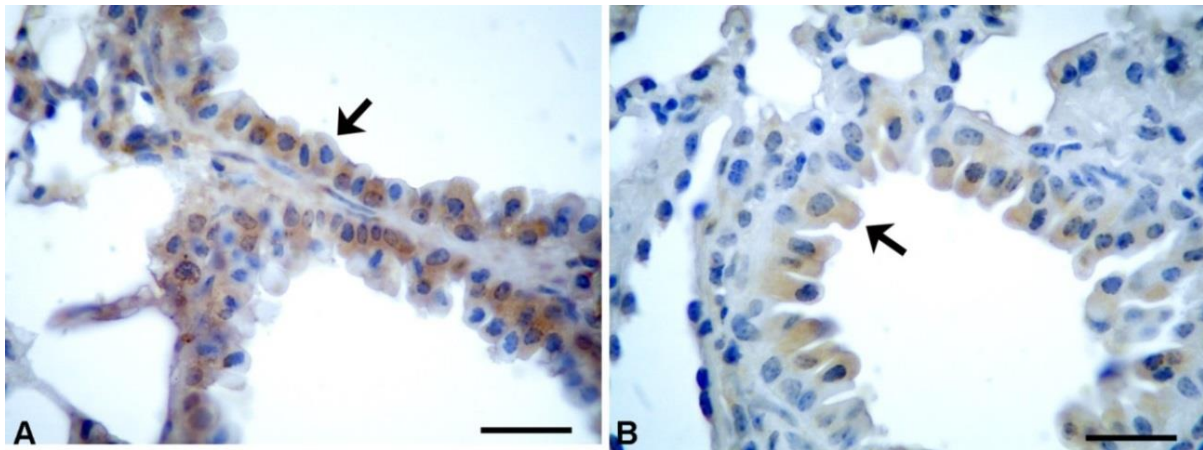


Figura 87. Inmunolocalización de ZIP14 en pulmón en el Modelo de Deficiencia de hierro. A) ZIP14 en células bronquiales de ratón control (flecha); B) ZIP14 en células bronquiales de ratón con deficiencia de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

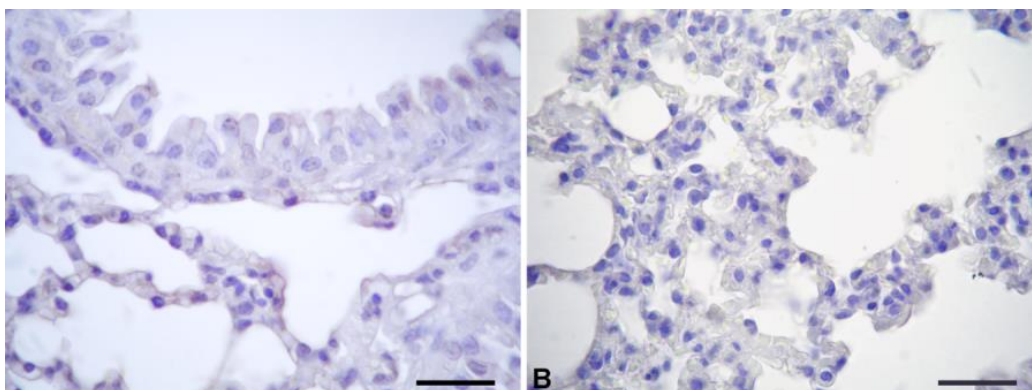


Figura 88. Control negativo del tejido pulmonar en el Modelo de Deficiencia de hierro. Tejido pulmonar incubado con PBS en lugar del anticuerpo primario contrastado con hematoxilina. A) Zona bronquial; B) Zona alveolar. Los tejidos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos. La barra representa 20 μ m.

Resultados

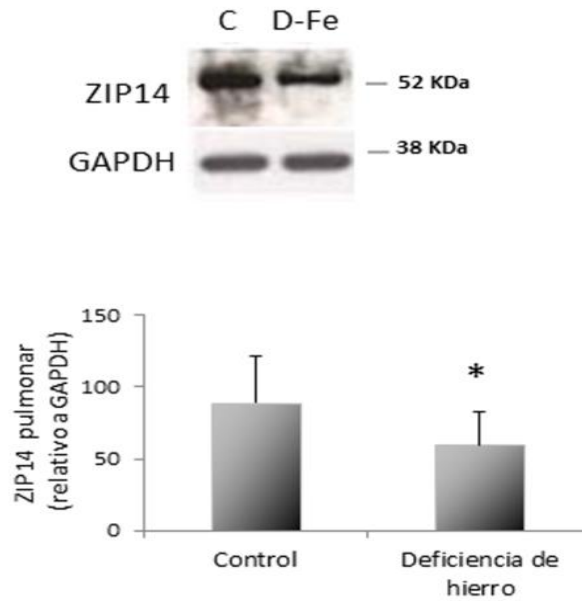


Figura 89. Western blot de ZIP14 pulmonar en el Modelo de Deficiencia de Hierro. C: ZIP14 en pulmón de ratón control; D-Fe: ZIP14 en pulmón de ratón con deficiencia de hierro. Los tejidos se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; * $p < 0.05$ deficiencia de hierro vs. control.

5.3.2.3. Transportador de metales divalentes 1 pulmonar

En deficiencia de hierro la inmunolocalización de DMT1 se identificó en la membrana apical de las células bronquiales, mientras que en la condición control se localizó en el citoplasma celular (Figuras 90A y B). En macrófagos alveolares, la inmunolocalización de DMT1 fue citoplasmática tanto en deficiencia de hierro como en el control (Figuras 90C y D).

Por *Western blot* se observó que el nivel de DMT1 pulmonar aumentó significativamente en deficiencia de hierro respecto al control, mostrando que el cambio de localización de DMT1 está asociado a los cambios en el contenido proteico (Figura 91).

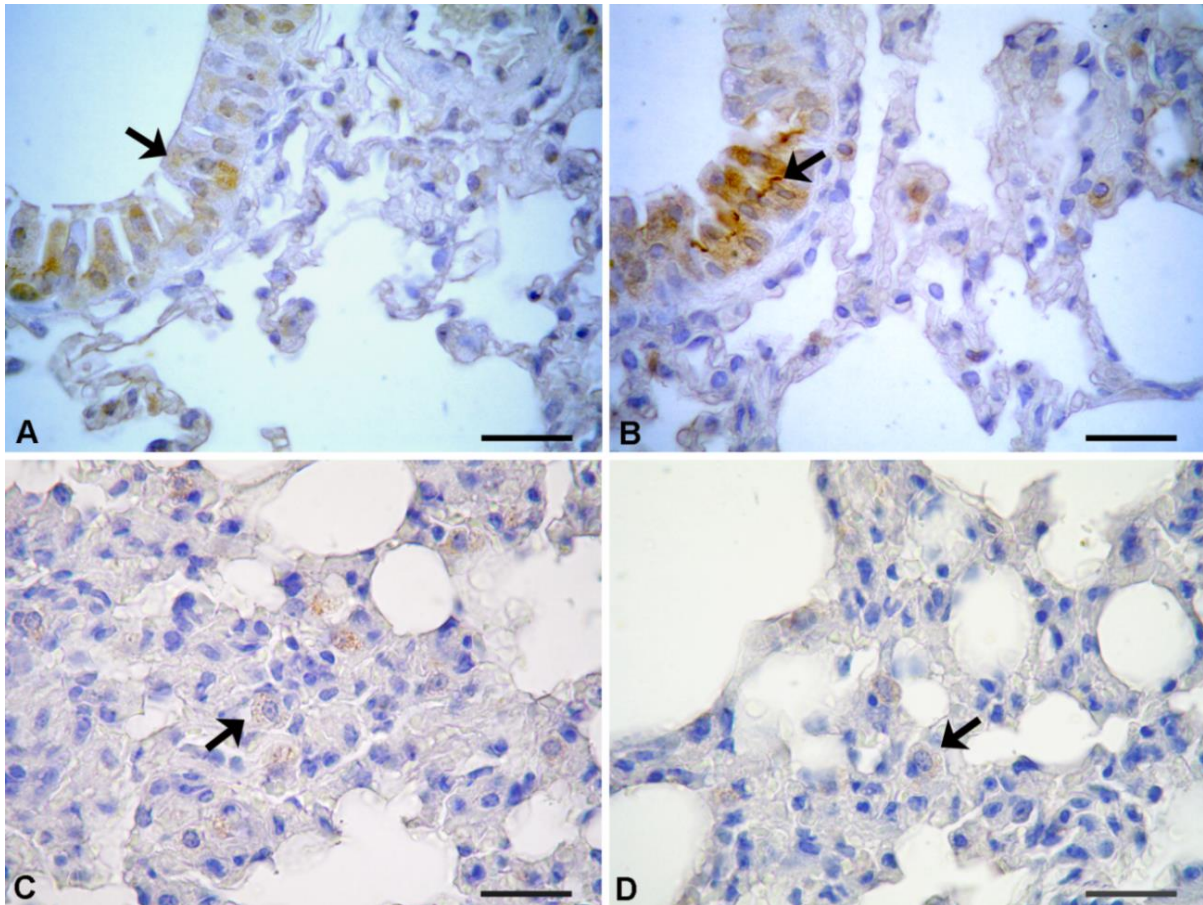


Figura 90. Inmunolocalización de DMT1 en pulmón en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) DMT1 en células bronquiales de ratón control (flecha); B) DMT1 en células bronquiales de ratón con deficiencia de hierro (flecha); C) DMT1 en macrófagos alveolares de ratón control (flecha); D) DMT1 en macrófagos alveolares de ratón con deficiencia de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

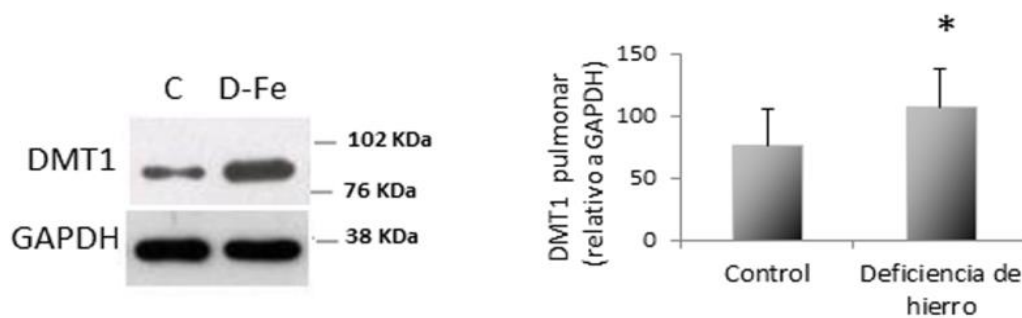


Figura 91. Western blot de DMT1 pulmonar en el Modelo de Deficiencia de Hierro. C: DMT1 en pulmón de ratón control; D-Fe: DMT1 en pulmón de ratón con deficiencia de hierro. Los tejidos se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; * $p < 0.05$ deficiencia de hierro vs. control.

5.3.2.4. Receptor de transferrina 1 pulmonar

El análisis del nivel proteico del RTf1 por *Western blot* mostró un aumento significativo del receptor en pulmón en deficiencia de hierro respecto a la condición control (Figura 92).

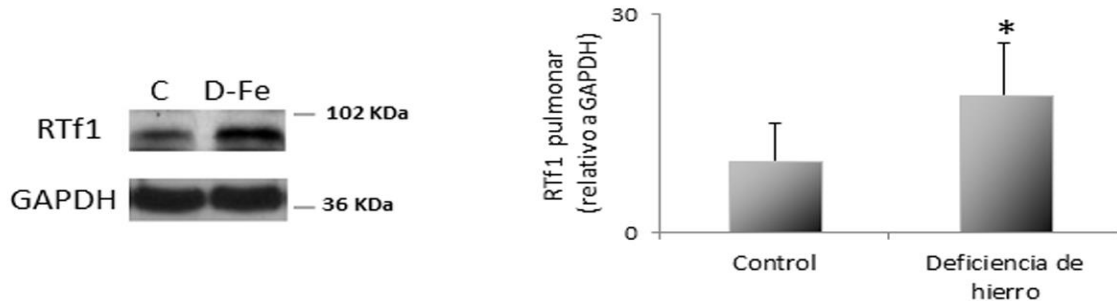


Figura 92. *Western blot* de RTf1 pulmonar en el Modelo de Deficiencia de Hierro. C: RTf1 en pulmón de ratón control; D-Fe: RTf1 en pulmón de ratón con deficiencia de hierro. Los tejidos se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; * p < 0.05 deficiencia de hierro vs. control.

5.3.2.5. Ferroportina pulmonar

En la condición control la inmunomarcación de FPN fue positiva en el citoplasma de las células bronquiales con una distribución homogénea (Figura 93A). Sin embargo, en deficiencia de hierro FPN se inmunolocalizó en el citoplasma con desplazamiento hacia la membrana apical de las células bronquiales (Figuras 93B). En los macrófagos alveolares, la expresión del exportador FPN detectada por inmunohistoquímica se identificó en el citoplasma celular tanto en deficiencia de hierro como en la condición control (Figuras 93C y D).

Mediante la técnica de *Western blot* no se observaron cambios significativos del nivel proteico de FPN pulmonar en deficiencia de hierro respecto al control (Figura 94).

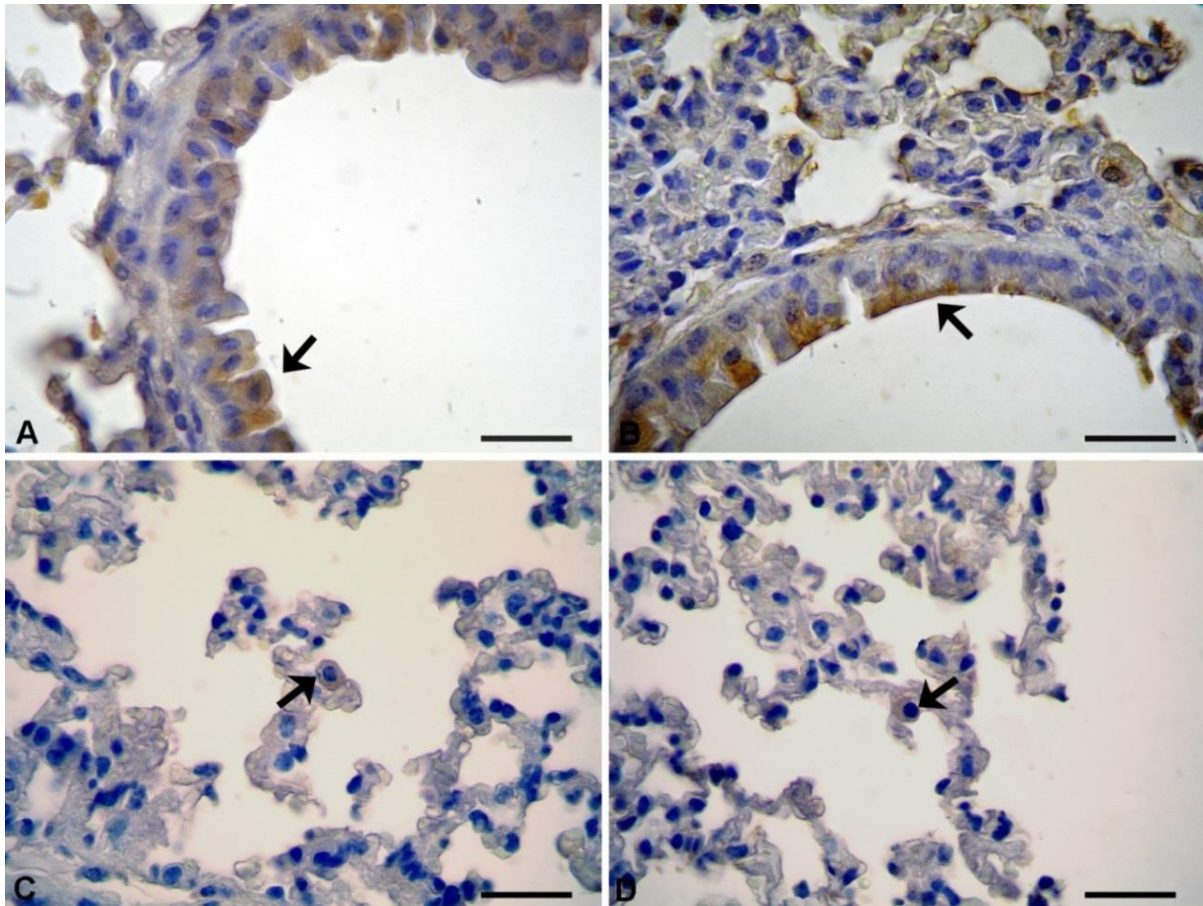


Figura 93. Inmunolocalización de FPN en pulmón en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) FPN en células bronquiales de ratón control (flecha); B) FPN en células bronquiales de ratón con deficiencia de hierro (flecha); C) FPN en macrófagos alveolares de ratón control (flecha); D) FPN en macrófagos alveolares de ratón con deficiencia de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μm .

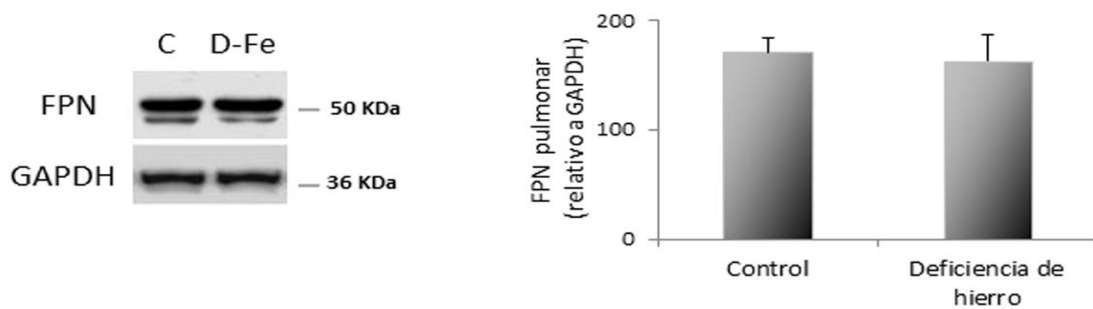


Figura 94. Western blot de FPN pulmonar en el Modelo de Deficiencia de Hierro. C: FPN en pulmón de ratón control; D-Fe: FPN en pulmón de ratón con deficiencia de hierro. Los tejidos se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar.

5.3.2.6. Proteína de la hemocromatosis pulmonar

En la condición control la inmunolocalización de la proteína de la hemocromatosis (HFE) fue intracelular en las células bronquiales con una distribución homogénea (Figura 95A). Sin embargo, en deficiencia de hierro HFE se localizó en el citoplasma con desplazamiento hacia la membrana apical (Figura 95B). En macrófagos alveolares se observó que la inmunomarcación citoplasmática de HFE fue similar en deficiencia de hierro y en el control (Figuras 95C y D).

Mediante ensayos de *Western blot* se observó un aumento significativo del nivel de HFE en pulmón en deficiencia de hierro respecto al control, mostrando que el cambio en la localización de HFE está asociado a los cambios en el contenido proteico (Figura 96).

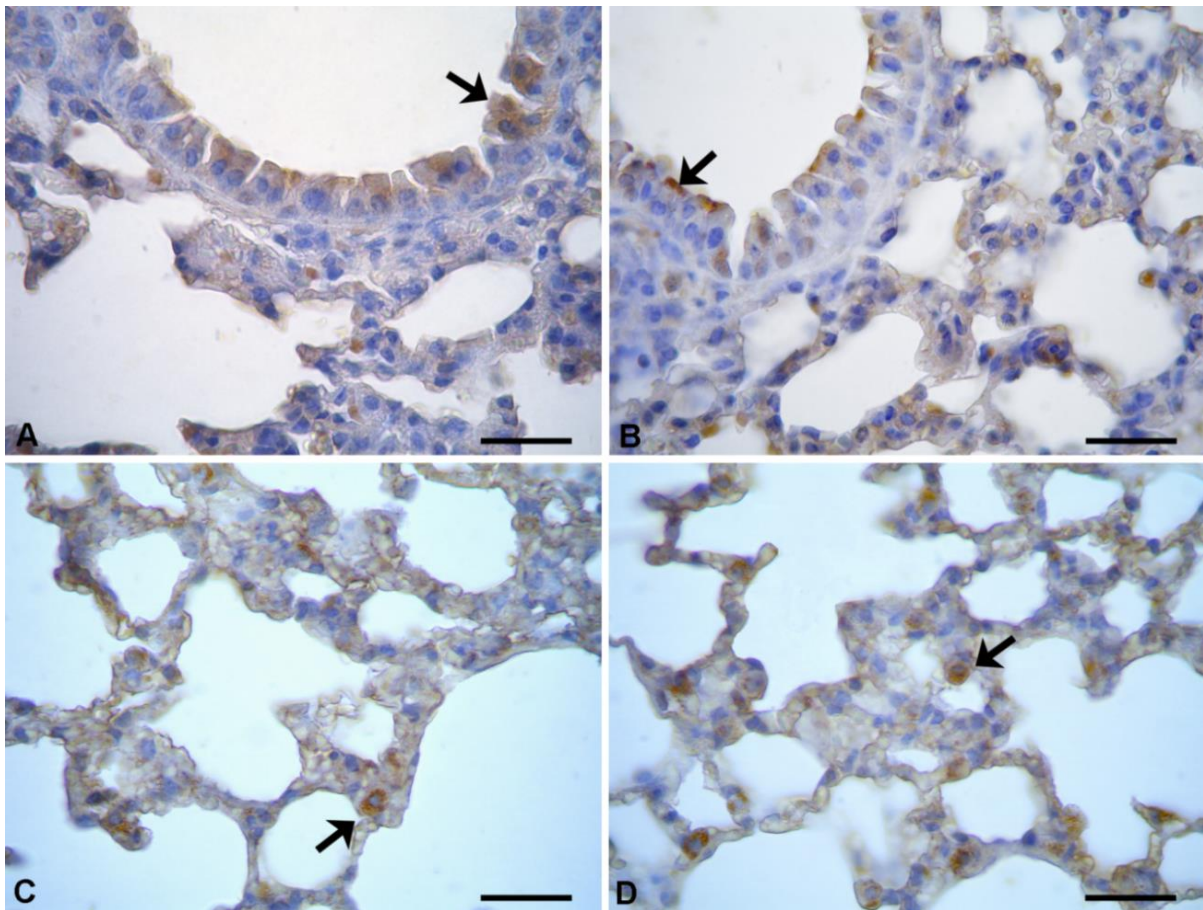


Figura 95. Inmunolocalización de HFE en pulmón en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) HFE en células bronquiales de ratón control (flecha); **B)** HFE en células bronquiales de ratón con deficiencia de hierro (flecha); **C)** HFE en macrófagos alveolares de ratón control (flecha); **D)** HFE en macrófagos alveolares de ratón con deficiencia de hierro (flecha). Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

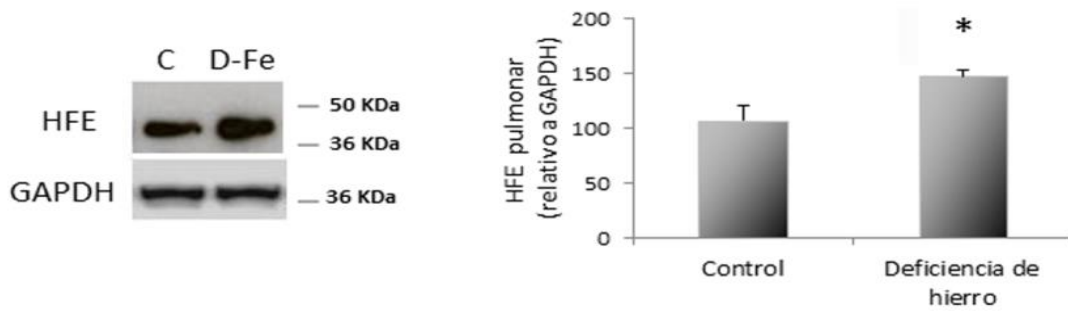


Figura 96. Western blot de HFE pulmonar en el Modelo de Deficiencia de Hierro. C: HFE en pulmón de ratón control; D-Fe: HFE en pulmón de ratón con deficiencia de hierro. Los tejidos se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; * $p < 0.05$ deficiencia de hierro vs. control.

5.3.2.7. Prohepcidina pulmonar

El análisis inmunohistoquímico de prohepcidina mostró una evidente positividad del péptido de hepcidina en las células bronquiales y en los macrófagos alveolares tanto en deficiencia de hierro como en el control (Figuras 97A y B).

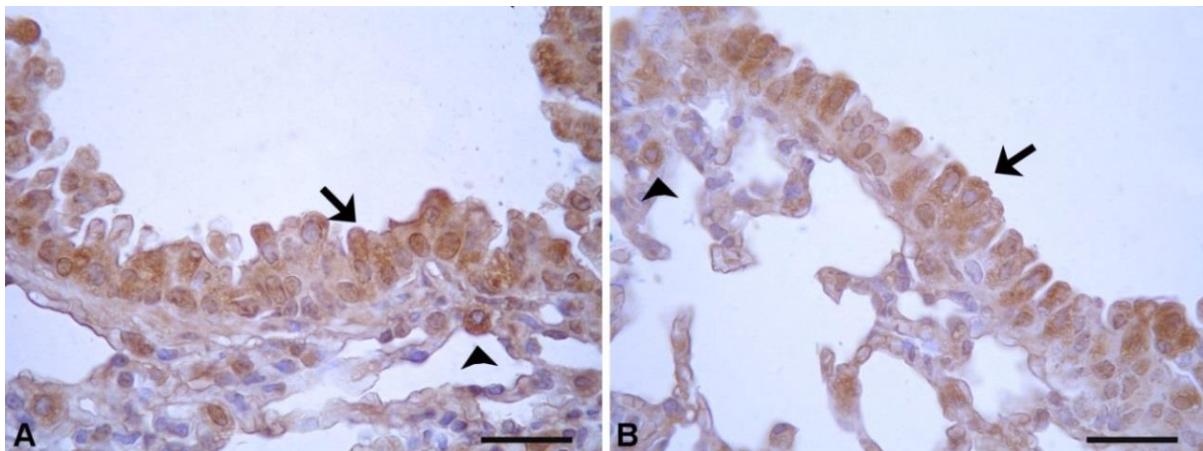


Figura 97. Inmunolocalización de prohepcidina en pulmón en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) Prohepcidina en células bronquiales (flecha) y en macrófagos alveolares (punta de flecha) de ratón control; B) Prohepcidina en células bronquiales (flecha) y en macrófagos alveolares (punta de flecha) de ratón con deficiencia de hierro. Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μ m.

5.3.2.8. L-ferritina pulmonar

La inmunomarcación de L-ferritina se identificó en el citoplasma de las células bronquiales y de los macrófagos alveolares tanto en deficiencia de hierro como en el control (Figuras 98A-D).

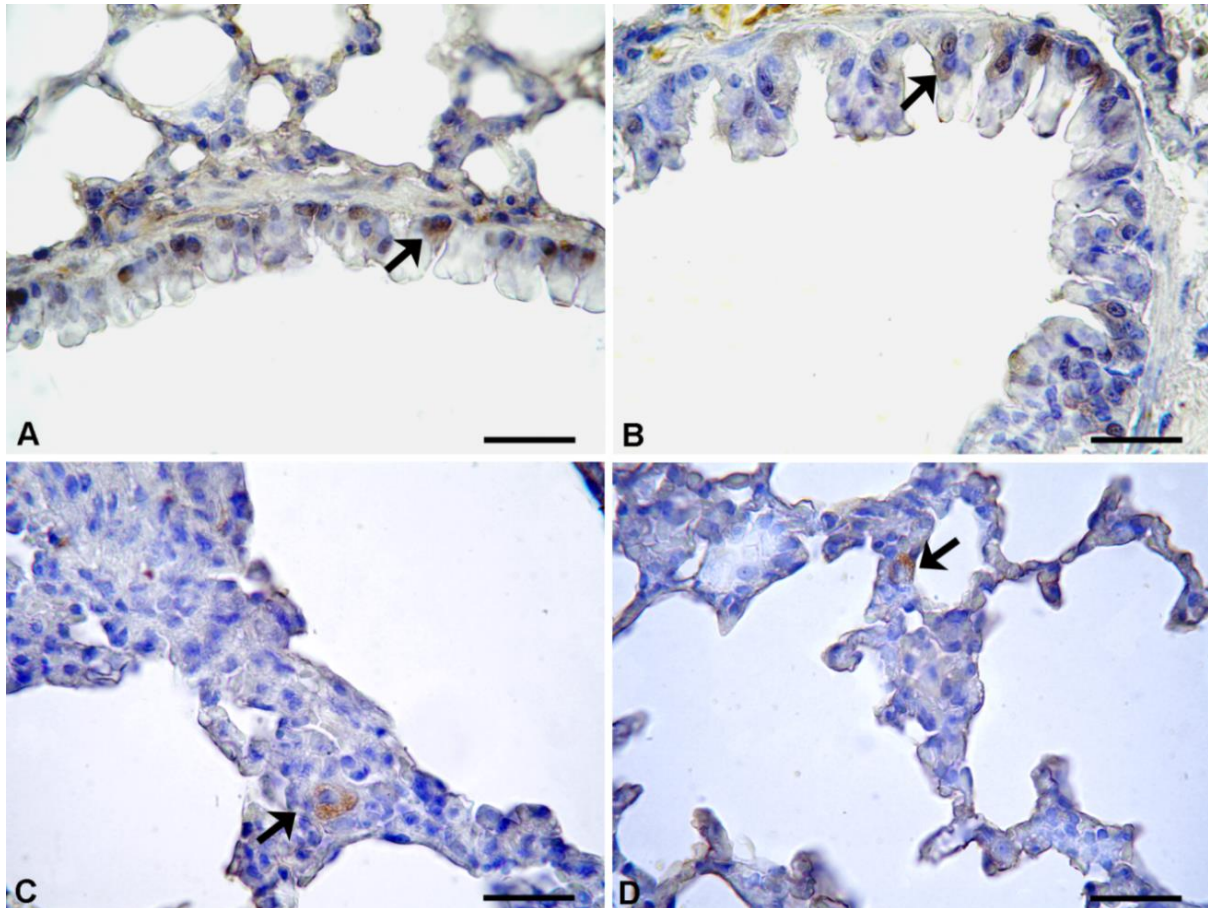


Figura 98. Inmunolocalización de L-ferritina en pulmón en el Modelo de Deficiencia de Hierro. A) L-ferritina en células bronquiales de ratón control (flecha); **B)** L-ferritina en células bronquiales de ratón con deficiencia de hierro (flecha); **C)** L-ferritina en macrófagos alveolares de ratón control (flecha); **D)** L-ferritina en macrófagos alveolares de ratón con deficiencia de hierro (flecha) Los tejidos se procesaron para inmunohistoquímica según lo descrito en Materiales y Métodos (n=4/grupo). La barra representa 20 μm .

Capítulo 6

Sistema Celular de Neuroblastoma Humano.
Caracterización de las proteínas del hierro y su
regulación en inflamación por estrés oxidativo

6.1. INTRODUCCIÓN

Se ha descrito que tanto el exceso de hierro como algunos procesos inflamatorios son asociados con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson (Núñez et al., 2012). Por ello, el abordaje de algunos aspectos de las bases moleculares que relacionan el estado de inflamación con el depósito de hierro neuronal podría constituir un aporte para el conocimiento de enfermedades neurodegenerativas.

En la Enfermedad de Parkinson, en humanos y en modelos, animales se demostró que la proteína reguladora del hierro 1 (IRP1) se activa, postulándose el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre su activación en estructuras de los ganglios basales, como la sustancia negra (Hirsch, 2006; Salazar et al., 2006). Otros autores señalaron en la Enfermedad de Parkinson la presencia de altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- α) en el cerebro y en el fluido cerebroespinal (Mogi et al., 1994; Mogi et al., 1996).

Estudios del laboratorio del Dr. Núñez mostraron en neuronas del hipocampo una asociación entre hierro e inflamación, describiendo que las citoquinas pro-inflamatorias producen acumulación neuronal de hierro (Urrutia et al., 2013). Estos estudios despertaron nuestro interés en evaluar, junto con el laboratorio del Dr. Núñez, los efectos de la inflamación mediada por citoquinas (IL-6 y TNF- α) y por LPS sobre la actividad de IRP1 y su relación funcional y regulatoria con DMT1, RTf1 y ferritina en células de neuroblastoma humano.

6.2. MODELO DE INFLAMACIÓN EN CÉLULAS SH-SY5Y

6.2.1. Descripción del modelo

El modelo de inflamación se desarrolló en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y por el agregado de las citoquinas IL-6 y TNF- α y del LPS al medio de incubación, en presencia o ausencia de antioxidante.

En células de neuroblastoma humano se evaluó el efecto de la inflamación sobre IRP1, DMT1, RTf1 y ferritina por el tratamiento con las citoquinas IL-6 y TNF- α y con LPS. Se evaluaron los efectos del antioxidante sobre la respuesta a las citoquinas y al LPS.

Células SH-SY5Y fueron pre-incubadas durante 30 minutos en presencia o ausencia (control) del antioxidante N-Acetil cisteína (NAC) 1mM y luego se incubaron durante 18 h con TNF- α (50 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml), LPS (1 ng/ μ l) y solución salina (Control) (Figura 99).

Las condiciones experimentales fueron: 1) Sin NAC: TNF- α , IL-6, LPS, Control; 2) Con NAC: NAC+TNF- α , NAC+ IL-6, NAC+ LPS y NAC (Control NAC).

En cada condición se realizaron los siguientes ensayos: EMSA para analizar la actividad de unión de IRP1 a IRE, ELISA para medir los niveles de ferritina y *Western blot* para evaluar los niveles proteicos de IRP1, DMT1 y RTf1 (Figura 99).

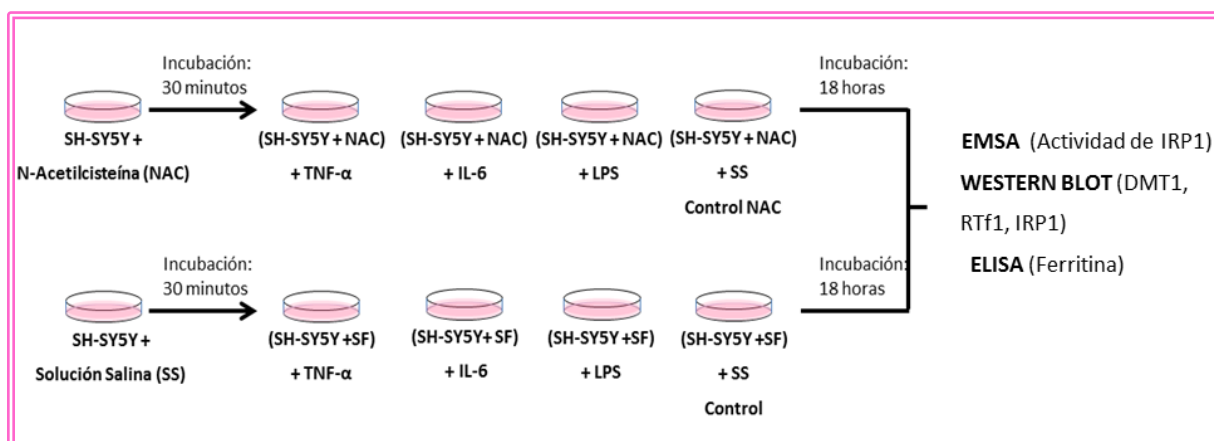


Figura 99. Esquema del Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y

6.2.2. Resultados

6.2.2.1. Regulación de IRP1 en células SH-SY5Y

Las proteínas reguladoras del hierro (IRPs) son proteínas citosólicas que unen elementos de respuesta al hierro (IREs) ubicados en la región 5' o 3' no traducida del ARNm que codifica para proteínas involucradas en la captación de hierro (RTf1 y DMT1), en su almacenamiento (ferritina) y en su exportación (FPN) (Anderson et al., 2012).

Existen dos proteínas IRPs denominadas IRP1 e IRP2, siendo IRP1 una proteína bifuncional. Cuando el hierro es escaso, IRP1 asume una configuración abierta por la pérdida de átomos de hierro en el *cluster* hierro-azufre y puede unirse al segmento IRE del ARNm, regulando la traducción proteica. Sin embargo, en exceso de hierro celular, IRP1 presenta actividad aconitasa. Las especies reactivas del oxígeno y la fosforilación de IRP1 afectan la estabilidad del *cluster* hierro-azufre, lo que aumenta la interacción de IRP1 a IRE (Wallander et al., 2006).

Acción de las citoquinas y del LPS

En las células SH-SY5Y se mostró por *Western blot* que el tratamiento con TNF- α , IL-6 y LPS no modificó el nivel proteico de IRP1 respecto al control (Figura 100). Para conocer si la actividad de IRP1 puede variar aunque no cambien los niveles de la proteína, se realizó la técnica de EMSA. Los resultados de EMSA mostraron que las citoquinas TNF- α e IL-6 y el LPS aumentaron la actividad de IRP1 en las células SH-SY5Y respecto al control (Figura 101).

Efecto del antioxidante sobre la acción de las citoquinas y del LPS

Las células SH-SY5Y fueron pre-incubadas por 30 minutos con el antioxidante NAC y luego se las trató durante 18 horas con TNF- α , IL-6, LPS y solución fisiológica (control). En las células pre-incubadas con NAC no se modificó el nivel proteico de IRP1 por la inflamación inducida con TNF- α , IL-6 y LPS, respecto a las células tratadas con NAC (sin citoquinas y sin LPS) (Figura 100). Por EMSA se mostró que en las células SH-SY5Y pre-incubadas con NAC, la actividad de IRP1 aumentó por el tratamiento con TNF- α , IL-6 y LPS respecto de las células tratadas con NAC (sin citoquinas y sin LPS) (Figura 101). A partir de estos resultados podemos concluir que el efecto activador de los estímulos inflamatorios sobre IRP1 no sería dependiente de ROS.

La especificidad del ensayo EMSA se confirmó mediante la realización de la técnica denominada "*supershift*". Esta técnica consiste en pre-incubar la muestra que contiene a la proteína en estudio (IRP1) con un anticuerpo contra esta proteína (anti-IRP1) (Fillebeen et al., 2014). Si el anticuerpo fuera específico, se retrasa la movilidad electroforética del complejo. Cuando ocurre la interacción anticuerpo-proteína-ARN no aparecerá banda en el revelado.

En nuestro experimento, la ausencia de banda en el revelado cuando pre-incubamos la muestra control con anti-IRP1 nos confirmó que los cambios en la actividad de unión observados en el ensayo EMSA se deben a la unión de IRP1 al ARN específico (Figura 101).

Resultados

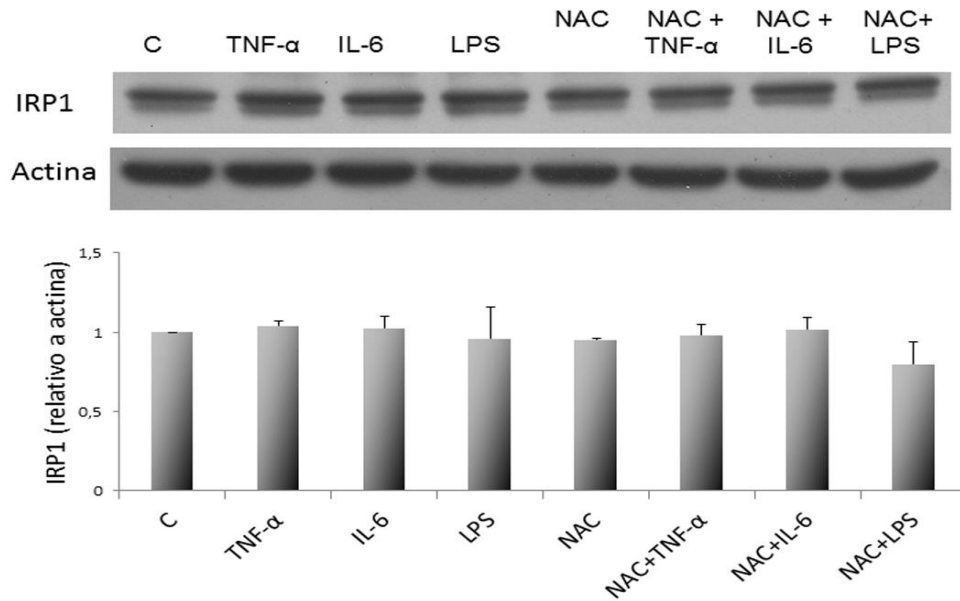


Figura 100. Western blot de IRP1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y. C: células SHSY-5Y tratadas con solución fisiológica, **TNF-α**: células SHSY-5Y tratadas con TNF-α, **IL-6**: células SHSY-5Y tratadas con IL-6, **LPS**: células SHSY-5Y tratadas con LPS, **NAC**: células SHSY-5Y tratadas con N-Acetil cisteína (NAC), **NAC + TNF-α**: células SHSY-5Y tratadas con NAC y TNF-α, **NAC +IL-6**: células SHSY-5Y tratadas con NAC e IL-6, **NAC +LPS**: células SHSY-5Y tratadas con NAC y LPS. Las células se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar.

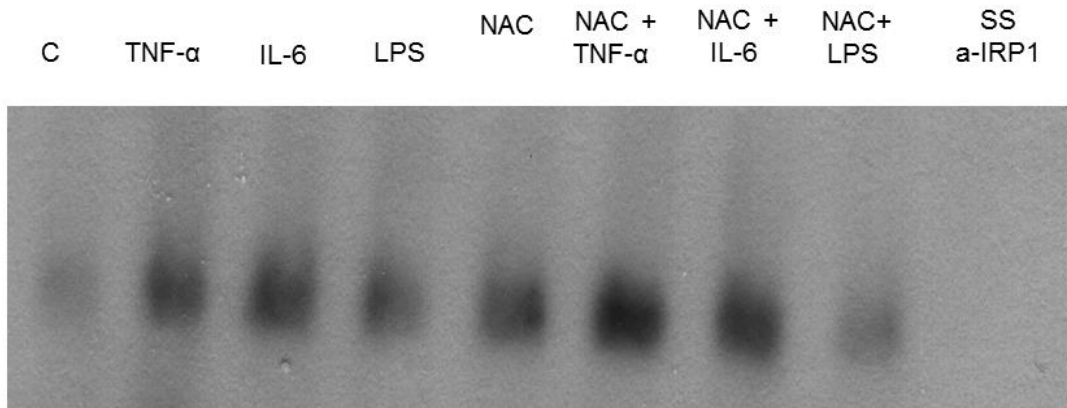


Figura 101. Actividad de IRP1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y. C: células SHSY-5Y tratadas con solución fisiológica, **TNF-α**: células SHSY-5Y tratadas con TNF-α, **IL-6**: células SHSY-5Y tratadas con IL-6, **LPS**: células SHSY-5Y tratadas con LPS, **NAC**: células SHSY-5Y tratadas con N-Acetil cisteína (NAC), **NAC + TNF-α**: células SHSY-5Y tratadas con NAC y TNFα, **NAC +IL-6**: células SHSY-5Y tratadas con NAC e IL-6, **NAC +LPS**: células SHSY-5Y tratadas con NAC y LPS; **SS a-IRP1**: "supershift" de la muestra control pre-incubada con anti-IRP1. Las células se procesaron para EMSA según lo descrito en Materiales y Métodos.

6.2.2.2. Regulación de DMT1 en células SH-SY5Y

Acción de las citoquinas y del LPS

El nivel proteico de DMT1 aumentó significativamente en las células SH-SY5Y tratadas con TNF- α e IL-6 respecto al control (C) (Figura 102). Sin embargo, en las células tratadas con LPS el nivel de DMT1 mostró un aumento no estadísticamente significativo respecto al control (C) (Figura 102).

Efecto del antioxidante sobre la acción de las citoquinas y del LPS

Muy interesantes fueron nuestros resultados obtenidos cuando pre-incubamos las células SH-SY5Y con NAC y luego las tratamos con TNF- α , IL-6 y LPS. Se observó que el nivel proteico de DMT1 disminuyó significativamente en los tratamientos NAC+TNF- α , NAC+IL-6 y NAC+LPS comparado con las células SH-SY5Y tratadas con TNF- α , IL-6 y LPS (sin NAC) respectivamente (Figura 102). Estos resultados muestran que el antioxidante NAC revierte el efecto de las citoquinas y del LPS sobre la expresión de DMT1.

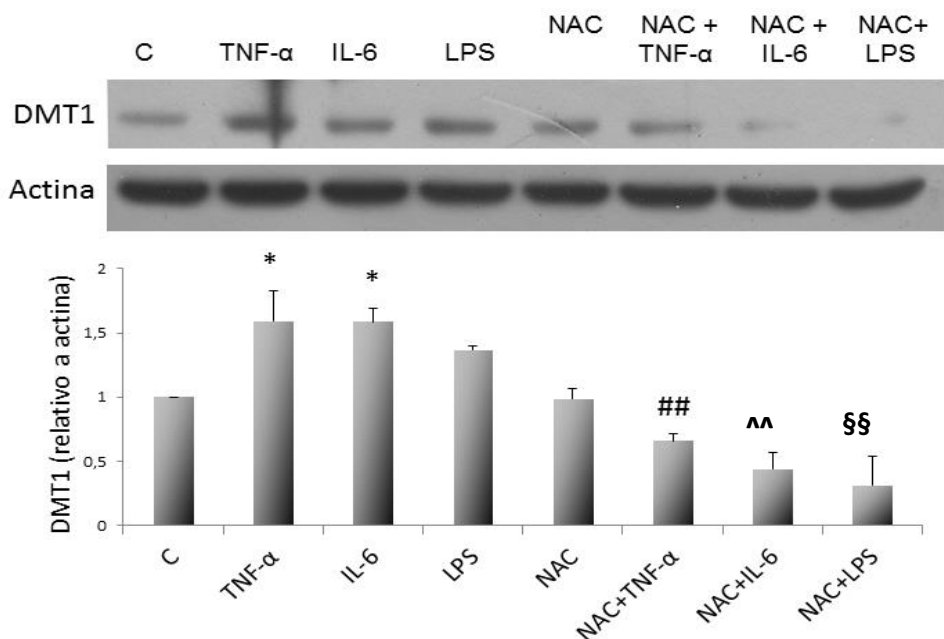


Figura 102. Western blot de DMT1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y. C: células SHSY-5Y tratadas con solución fisiológica, **TNF- α** : células SHSY-5Y tratadas con TNF- α , **IL-6**: células SHSY-5Y tratadas con IL-6, **LPS**: células SHSY-5Y tratadas con LPS, **NAC**: células SHSY-5Y tratadas con N-Acetil cisteína (NAC), **NAC + TNF- α** : células SHSY-5Y tratadas con NAC y TNF- α , **NAC +IL-6**: células SHSY-5Y tratadas con NAC e IL-6, **NAC +LPS**: células SHSY-5Y tratadas con NAC y LPS. Las células se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; * $p < 0.05$ TNF- α vs. control; IL-6 vs. control. ## $p < 0.01$ NAC+TNF- α vs. TNF- α ; ^^ $p < 0.01$ NAC+IL-6 vs. IL-6; §§ $p < 0.01$ NAC+LPS vs. LPS.

6.2.2.3. Regulación de RTf1 en células SH-SY5Y

Acción de las citoquinas y del LPS

En las células SH-SY5Y se mostró por *Western blot* que el tratamiento con TNF- α , IL-6 y LPS no modificó el nivel proteico de RTf1 respecto al control (Figura 103).

Efecto del antioxidante sobre la acción de las citoquinas y del LPS

En células pre-incubadas con NAC, los tratamientos NAC+TNF- α , NAC+IL-6 y NAC+LPS no modificaron el nivel proteico de RTf1 respecto a las células tratadas con TNF- α , IL-6 y LPS (sin NAC) respectivamente (Figura 103).

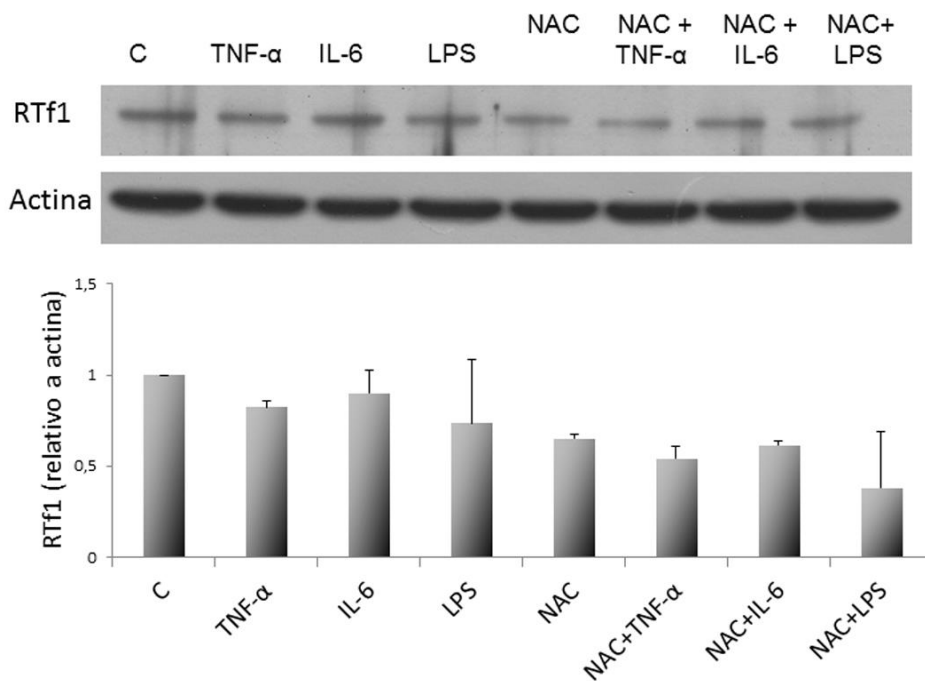


Figura 103. *Western blot* de RTf1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y. C: células SHSY-5Y tratadas con solución fisiológica, **TNF- α** : células SHSY-5Y tratadas con TNF- α , **IL-6**: células SHSY-5Y tratadas con IL-6, **LPS**: células SHSY-5Y tratadas con LPS, **NAC**: células SHSY-5Y tratadas con N-Acetil cisteína (NAC), **NAC + TNF- α** : células SHSY-5Y tratadas con NAC y TNF- α , **NAC +IL-6**: células SHSY-5Y tratadas con NAC e IL-6, **NAC +LPS**: células SHSY-5Y tratadas con NAC y LPS. Las células se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar.

6.2.2.4. Regulación de ferritina en células SH-SY5Y

Acción de las citoquinas y del LPS

En las células SH-SY5Y se observó por ELISA que el tratamiento con TNF- α aumentó significativamente el nivel de ferritina respecto al control (Figura 104). Sin embargo, en las células tratadas con IL-6 y LPS el nivel de ferritina mostró un aumento no estadísticamente significativo respecto al control (C) (Figura 104).

Efecto del antioxidante sobre la acción de las citoquinas y del LPS

Cuando pre-incubamos las células SH-SY5Y con NAC y luego las tratamos con TNF- α , IL-6 y LPS, se observó que el nivel de ferritina disminuyó significativamente en los tratamientos NAC+TNF- α , NAC+IL-6 y NAC comparado con las células tratadas con TNF- α , IL-6 y solución fisiológica (control) respectivamente (Figura 104). En las células tratadas con NAC+LPS el nivel de ferritina mostró una disminución no estadísticamente significativa respecto de las tratadas con LPS (sin NAC) (Figura 104). A partir de estos resultados podemos concluir que el antioxidante NAC disminuye los niveles de ferritina en las células con y sin inflamación.

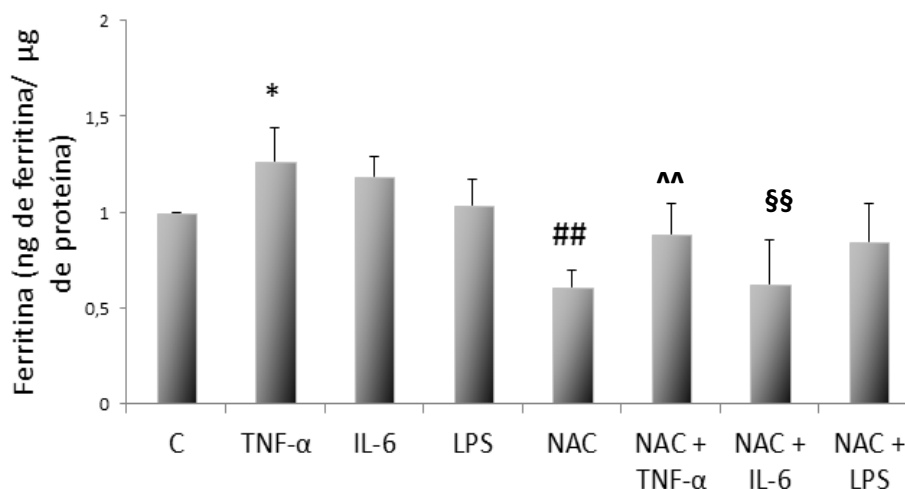


Figura 104. Niveles de ferritina en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y. C: células SHSY-5Y tratadas con solución fisiológica, **TNF- α** : células SHSY-5Y tratadas con TNF- α , **IL-6**: células SHSY-5Y tratadas con IL-6, **LPS**: células SHSY-5Y tratadas con LPS, **NAC**: células SHSY-5Y tratadas con N-Acetil cisteína (NAC), **NAC + TNF- α** : células SHSY-5Y tratadas con NAC y TNF- α , **NAC +IL-6**: células SHSY-5Y tratadas con NAC e IL-6, **NAC +LPS**: células SHSY-5Y tratadas con NAC y LPS. Las células se procesaron para ELISA según lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar; * $p < 0.05$ TNF- α vs. control; ## $p < 0.01$ NAC vs. control; ^^ $p < 0.01$ NAC+TNF- α vs. TNF- α ; §§ $p < 0.01$ NAC+IL-6 vs. IL-6.

6.3. MODELO DE INFLAMACIÓN EN CÉLULAS SH-SY5Y *KNOCKDOWN* PARA IRP1

6.3.1. Descripción del modelo

Para evaluar la función reguladora de IRP1 sobre DMT1, RTf1 y ferritina en inflamación, se utilizó un sistema de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) *knockdown* para IRP1. En las células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1 la inflamación fue inducida por IL-6, TNF- α y LPS.

En el diseño experimental, células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1 (Clon 9) y células transfectadas con el vector puro (células Puras) son tratadas durante 18 h con TNF- α (50 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml), LPS (1 ng/ μ l) y solución salina (Control).

Las condiciones experimentales fueron: 1) SH-SY5Y *knockdown* para IRP1 (Clon 9, C9): C9 TNF- α , C9 IL-6, C9 LPS y C9 control; 2) SH-SY5Y transfectadas con el vector puro (Puras, P): P TNF- α , P IL-6, P LPS, P control (Figura 105).

En cada condición se realizaron los siguientes ensayos: EMSA para analizar la actividad de unión de IRP1 a IRE, ELISA para medir los niveles de ferritina, RT-PCR para analizar los niveles del ARNm de IRP1 y DMT1, y *Western blot* para evaluar los niveles proteicos de IRP1, DMT1 y RTf1 (Figura 105).

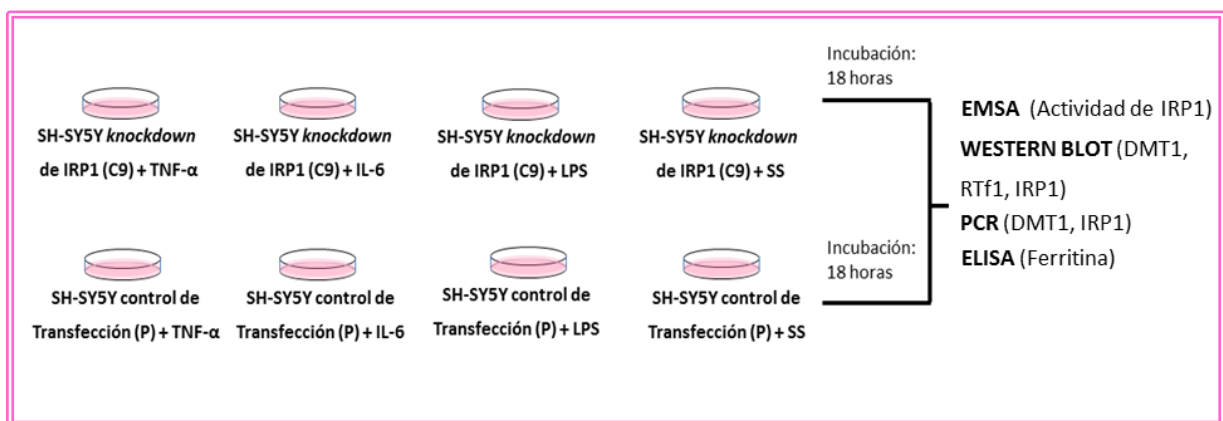


Figura 105. Esquema del Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1

6.3.2. Resultados

6.3.2.1. Regulación de IRP1 en células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1

En células *knockdown* para IRP1 (Clon 9) se observó por *Western blot* una disminución significativa del nivel proteico de IRP1 respecto a las células transfectadas con el vector puro (Puras) (Figura 106). Estos resultados evidencian que el Clon 9 posee una baja expresión proteica de IRP1. Cuando se estudió el efecto de la inflamación inducida por TNF- α , IL-6 y LPS sobre la proteína IRP1 en las células *knockdown*, se observó un aumento no significativo del nivel de IRP1 respecto de las células *knockdown* control (sin citoquinas y sin LPS), con valores similares a los que presentaron las células que expresan niveles normales de IRP1 (Figura 106). A partir de estos resultados podemos concluir los tratamientos con TNF- α , IL-6 y LPS podrían aumentar los niveles proteicos de IRP1 en las células que expresan bajos niveles de esta proteína citosólica (células *knockdown* para IRP1).

Los estudios del ARNm de IRP1 por RT-PCR mostraron que el nivel del ARNm aumentó no significativamente en las células *knockdown* tratadas con TNF- α e IL-6 respecto de las células *knockdown* control (sin citoquinas y sin LPS), siendo menor la tendencia en aumento observada con LPS (Figura 107).

Con el objetivo de conocer si el aumento en la expresión de IRP1 en las células *knockdown* en inflamación se asocia a cambios en su actividad se realizó la técnica de EMSA. En primer término se observó que la actividad de IRP1 fue baja en las células *knockdown* control (C9 Control) respecto a las células puras control (P control). Estos resultados confirman que los Clones 9 poseen baja actividad de IRP1 (Figura 108). Posteriormente, se analizó el efecto de la inflamación inducida con TNF- α , IL-6 y LPS sobre la actividad de IRP1 en las células *knockdown* (C9) mediante EMSA. Estos estudios mostraron que la actividad de IRP1 no cambió en las células *knockdown* tratadas con TNF- α , IL-6 y LPS respecto a las células *knockdown* control (sin citoquinas y sin LPS) (Figura 108). Por lo que podemos concluir que en las células *knockdown* para IRP1, la inflamación inducida por IL-6, TNF- α y LPS no modifica la actividad de IRP1, a pesar del aumento de la proteína observado por *Western blot*.

Resultados

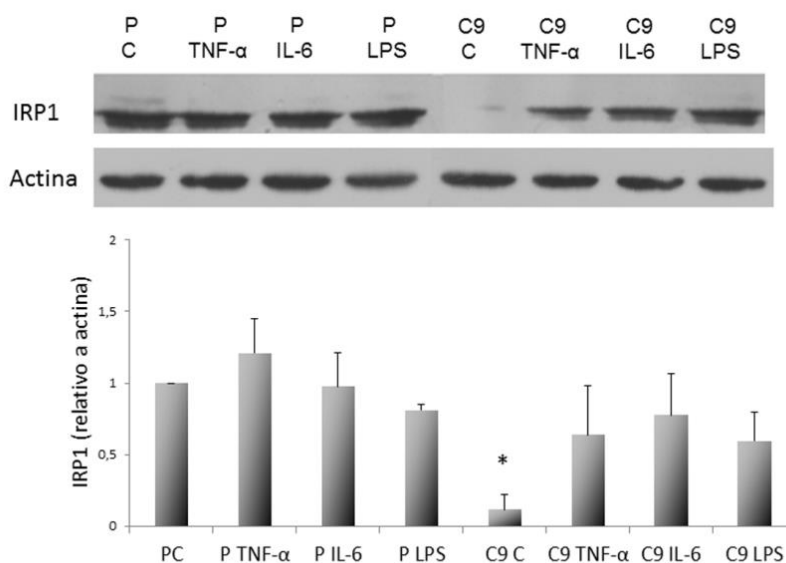


Figura 106. Western blot de IRP1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1. PC: células transfectadas con el vector puro tratadas con solución fisiológica (Control, C), **PTNF-α**: células transfectadas con el vector puro tratadas con TNF-α, **PIL6**: células transfectadas con el vector puro tratadas con IL-6, **PLPS**: células transfectadas con el vector puro tratadas con LPS, **C9C**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con solución fisiológica, **C9TNF-α**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con TNF-α, **C9IL-6**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con IL-6, **C9LPS**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con LPS. Las células se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como la media ± desvío estándar; * $p < 0.05$ C9 control vs. P control.

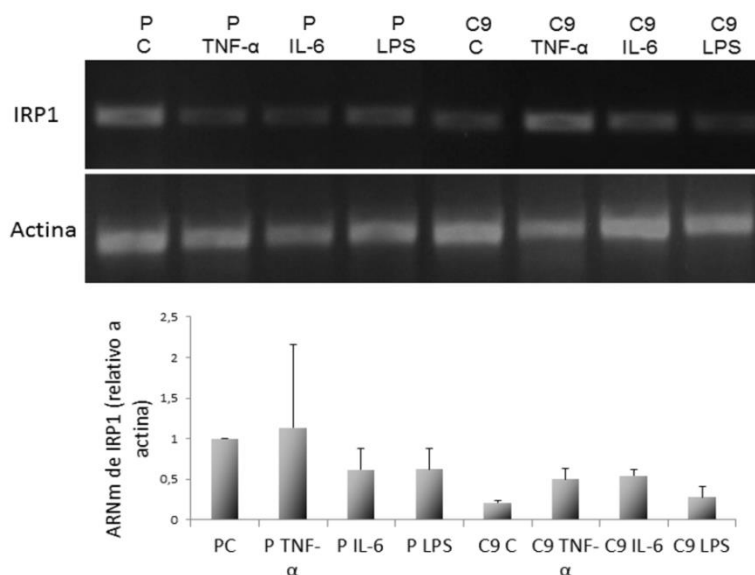


Figura 107. RT-PCR de IRP1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1. PC: células transfectadas con el vector puro tratadas con solución fisiológica (Control, C), **PTNF-α**: células transfectadas con el vector puro tratadas con TNF-α, **PIL6**: células transfectadas con el vector puro tratadas con IL-6, **PLPS**: células transfectadas con el vector puro tratadas con LPS, **C9C**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con solución fisiológica, **C9TNF-α**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con TNF-α, **C9IL-6**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con IL-6, **C9LPS**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con LPS. Las células se procesaron para RT-PCR según lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como la media ± desvío estándar.

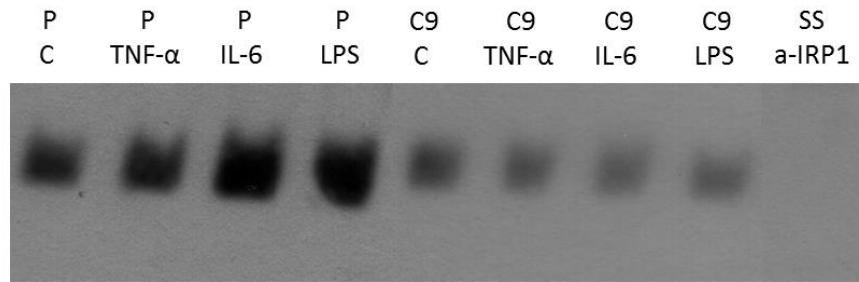


Figura 108. Actividad de IRP1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1. **PC:** células transfectadas con el vector puro tratadas con solución fisiológica (Control, C), **PTNF- α :** células transfectadas con el vector puro tratadas con TNF- α , **PIL6:** células transfectadas con el vector puro tratadas con IL-6, **PLPS:** células transfectadas con el vector puro tratadas con LPS, **C9C:** células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con solución fisiológica, **C9TNF- α :** células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con TNF- α , **C9IL-6:** células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con IL-6, **C9LPS:** células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con LPS; **SS a-IRP1:** *super shift* de la muestra control pre-incubada con anti-IRP1. Las células se procesaron para EMSA según lo descrito en Materiales y Métodos.

6.3.2.2. Regulación de DMT1 en células SHSY-5Y *knockdown* para IRP1

En las células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1 control (sin citoquinas y sin LPS), el nivel proteico de DMT1 fue bajo respecto a las células Puras control (sin citoquinas y sin LPS) (Figura 109). En las células *knockdown* para IRP1 tratadas con TNF- α , IL-6 y LPS el nivel de DMT1 mostró un aumento no significativo respecto de las células *knockdown* control (sin citoquinas y sin LPS) (C9 Control) (Figura 109). Podemos concluir que la inflamación por TNF- α , IL-6 y LPS induciría un aumento de los niveles de DMT1 en las células que expresan bajos niveles de IRP1.

Para ampliar nuestro estudio sobre la regulación de DMT1 en las células *knockdown* en inflamación, se estudió por RT-PCR el ARNm de las isoformas IRE y no IRE de DMT1. DMT1 IRE y DMT1 no IRE se producen por corte alternativo en el extremo 3' del gen de DMT1 que genera dos isoformas del ARNm de la proteína: la isoforma I (IRE), caracterizada por la presencia de un elemento de respuesta al hierro (IRE), y la isoforma II (no IRE) que carece de dicho elemento (Lee PL et al., 1998).

En células *knockdown* tratadas con TNF- α , IL-6 y LPS, el nivel del ARNm de DMT1 IRE y no IRE no cambió significativamente. Sin embargo, mostraron una tendencia en aumento respecto de las células *knockdown* control (sin citoquinas y sin LPS) (C9 Control) (Figura

110). A partir de estos resultados podemos concluir que en células *knockdown* el aumento de DMT1 por citoquinas y LPS podría ser mediado por una regulación transcripcional.

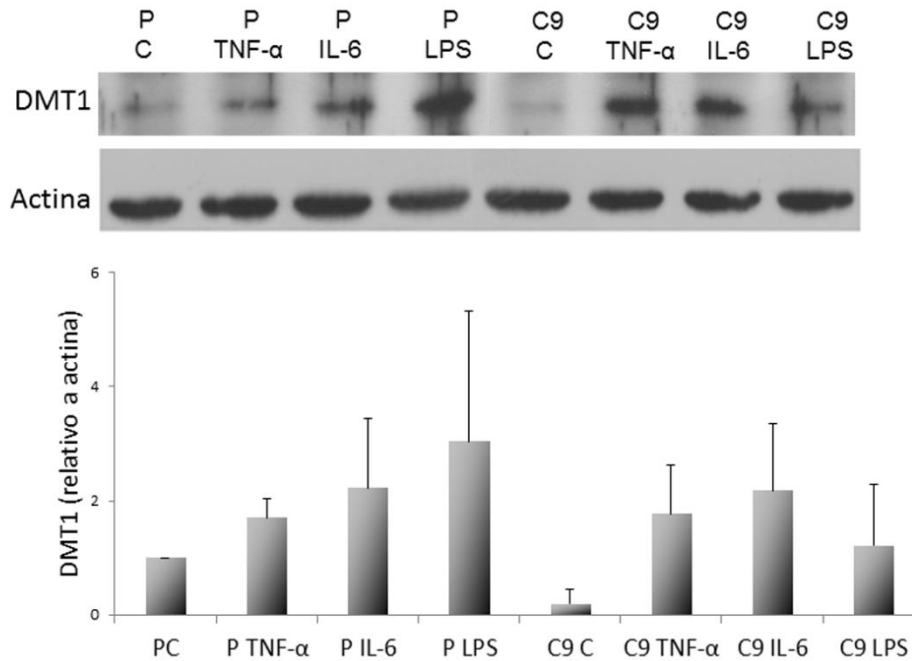


Figura 109. Western blot de DMT1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1. PC: células transfectadas con el vector puro tratadas con solución fisiológica (Control, C), **PTNF-α**: células transfectadas con el vector puro tratadas con TNF-α, **PIL6**: células transfectadas con el vector puro tratadas con IL-6, **PLPS**: células transfectadas con el vector puro tratadas con LPS, **C9C**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con solución fisiológica, **C9TNF-α**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con TNF-α, **C9IL-6**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con IL-6, **C9LPS**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con LPS. Las células se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar.

Resultados

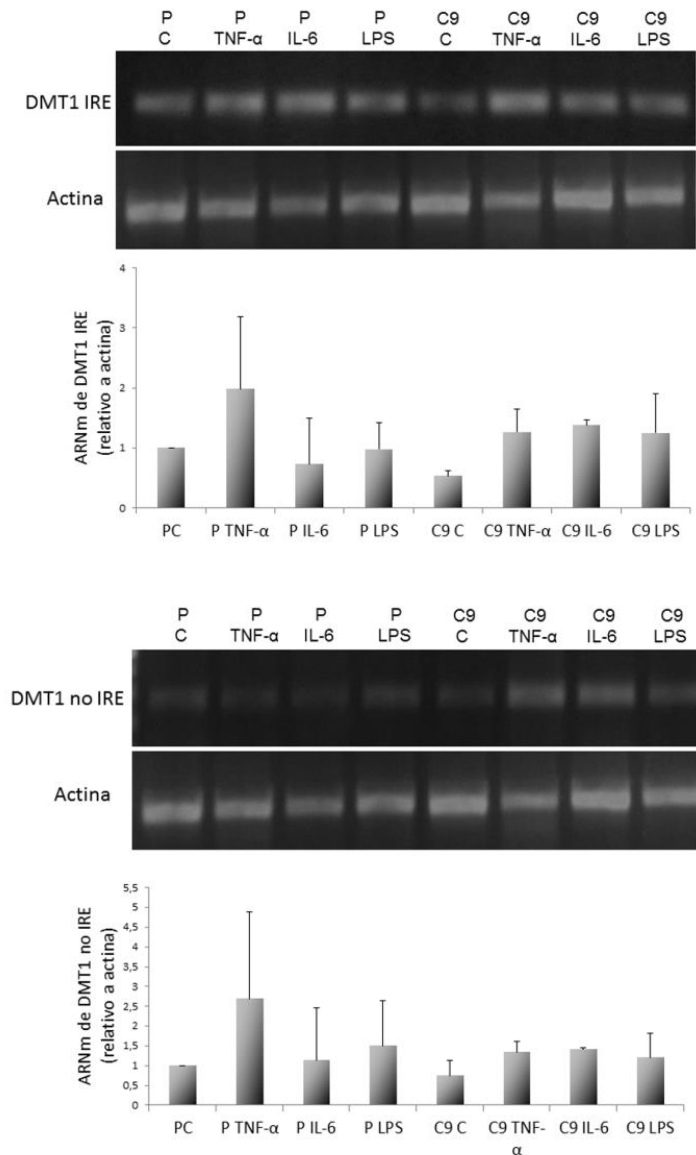


Figura 110. RT-PCR de DMT1 IRE y no IRE en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1. PC: células transfectadas con el vector puro tratadas con solución fisiológica (Control, C), **PTNF- α** : células transfectadas con el vector puro tratadas con TNF- α , **PIL6**: células transfectadas con el vector puro tratadas con IL-6, **PLPS**: células transfectadas con el vector puro tratadas con LPS, **C9C**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con solución fisiológica, **C9TNF- α** : células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con TNF- α , **C9IL-6**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con IL-6, **C9LPS**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con LPS. Las células se procesaron para RT-PCR según lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar.

6.3.2.3. Regulación de RTf1 en células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1

En las células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1 se mostró por *Western blot* que el tratamiento con TNF- α , IL-6 y LPS no modificó el nivel proteico de RTf1 respecto a las células *knockdown* control (sin citoquinas y sin LPS) (Figura 111).

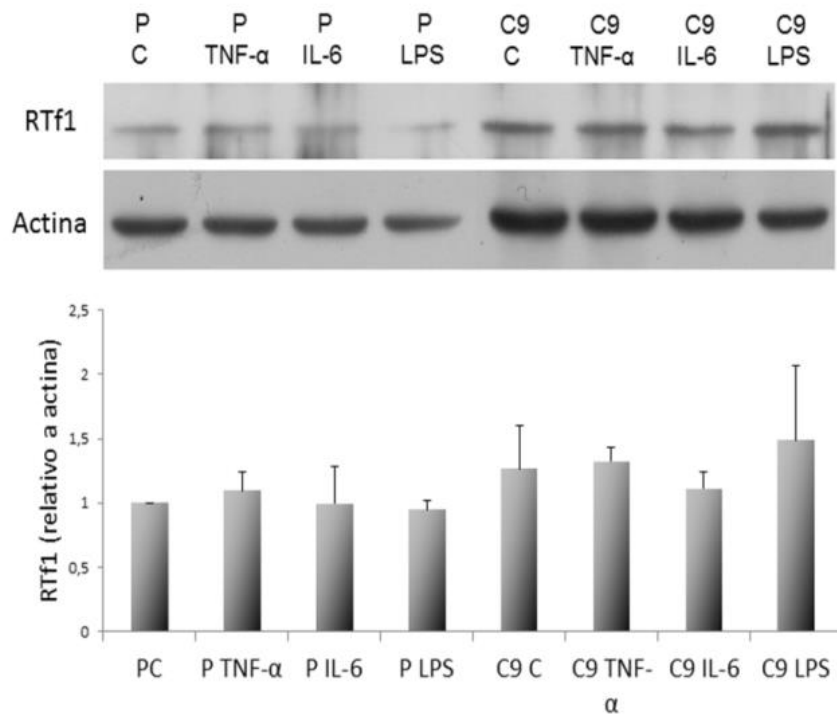


Figura 111. Western blot de RTf1 en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1. PC: células transfectadas con el vector puro tratadas con solución fisiológica (Control, C), **PTNF-α**: células transfectadas con el vector puro tratadas con TNF-α, **PIL6**: células transfectadas con el vector puro tratadas con IL-6, **PLPS**: células transfectadas con el vector puro tratadas con LPS, **C9C**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con solución fisiológica, **C9TNF-α**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con TNF-α, **C9IL-6**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con IL-6, **C9LPS**: células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con LPS. Las células se procesaron para *Western blot* según lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar.

6.3.2.4. Regulación de ferritina en células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1

En las células *knockdown* para IRP1 se mostró por ELISA que el nivel de ferritina aumentó significativamente en las condiciones C9C, C9TNF-α, C9IL-6 y C9LPS, comparado con PC, PTNF-α, PIL-6 y PLPS, respectivamente (Figura 112). Estos resultados nos permiten concluir que los niveles de ferritina aumentan en las células *knockdown* para IRP1 con y sin inflamación.

Resultados

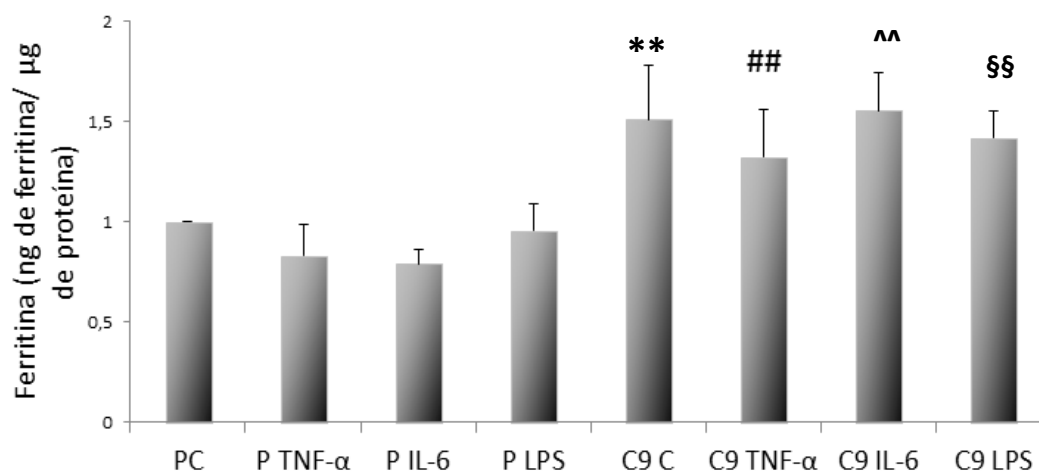


Figura 112. Niveles de ferritina en el Modelo de Inflamación en células SH-SY5Y *knockdown* para IRP1. **PC:** células transfectadas con el vector puro tratadas con solución fisiológica (Control, C), **PTNF-α:** células transfectadas con el vector puro tratadas con TNF-α, **PIL6:** células transfectadas con el vector puro tratadas con IL-6, **PLPS:** células transfectadas con el vector puro tratadas con LPS, **C9C:** células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con solución fisiológica, **C9TNF-α:** células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con TNF-α, **C9IL-6:** células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con IL-6, **C9LPS:** células *knockdown* para IRP1 (Clon9, C9) tratadas con LPS. Las células se procesaron para ELISA según lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como la media ± desvío estándar; ** $p < 0.01$ C9 control vs P control; ## $p < 0.01$ C9 TNF-α vs. P TNF-α; ^^ $p < 0.01$ C9 IL-6 vs. P IL-6; §§ $p < 0.01$ C9 LPS vs. P LPS.

DISCUSIÓN

Capítulo 1

Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro.
Evaluación de la eritropoyesis
y de la ferremia

El ratón como Modelo Biológico

El ratón de laboratorio es el modelo biológico más empleado en ciencia. Se conoce que el humano y el ratón (*Mus musculus*) comparten el 99% de su genoma (30.000 genes), siendo el 1% restante (300 genes) propios de cada especie (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Por ello, el ratón es el modelo animal por excelencia para estudiar enfermedades que afectan a humanos desde el nivel celular hasta su manifestación clínica.

La expresión del gen de la hormona hepcidina, reguladora central del metabolismo del hierro, se ha identificado en humanos (HAMP) y en ratones (HAMP 1 y HAMP 2) (Lou et al., 2004). En ambas especies se han caracterizado proteínas que regulan la captación y movilización del hierro (Ganz & Nemeth, 2006; Lopes et al., 2010). Además, las proteínas del hierro están conservadas en humanos y en ratones y los valores cuantitativos del hierro son similares a los determinados en humanos, considerando la escala del tamaño corporal (Lopes et al., 2010).

Los antecedentes descritos muestran la ventaja biológica del desarrollo de modelos animales murinos para llevar a cabo nuestros estudios sobre el metabolismo del hierro, a lo que se suma la regulación diferencial de hepcidina descrita tanto en estudios *in vivo* como en *in vitro* (Pigeon et al., 2001; Nemeth et al., 2003).

El desarrollo y la optimización de modelos de disfunción de Deficiencia y de Sobrecarga de Hierro, fueron esenciales para la identificación celular de proteínas del ciclo del hierro y para investigar su regulación en tejidos estrechamente vinculados con la dishomeostasis del biometal.

Aspectos bioéticos para el empleo de Animales de Laboratorio como Modelo Biológico

Introduciremos conceptos actuales sobre las normas bioéticas para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación que fueron tenidos en cuenta en este trabajo de tesis.

Es importante destacar que la manipulación de los animales fue realizada por personal altamente capacitado en el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Los integrantes de nuestro grupo de investigación se capacitaron mediante cursos internacionales que otorgan la categoría C según la Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias del Animal de

Laboratorio (FELASA), que categoriza así al personal responsable para dirigir y diseñar los procedimientos. También se entrenaron en el reconocimiento de los signos de dolor o malestar (NRC, 2008). En los Modelos Animales desarrollados en nuestro laboratorio, los procedimientos seguidos se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del NIH (Committee on Care and Use of Laboratory Animals, 1996).

En el Modelo de Sobrecarga de Hierro se empleó la vía intraperitoneal para administrar el hierro, técnica comúnmente usada en roedores de laboratorio (Turner et al., 2011). El material inyectado, hierro sacarato, fue estéril y no irritante, dado que en la literatura se ha descrito que la administración intraperitoneal de sustancias irritantes o no estériles puede producir obstrucción intestinal dolorosa y/o peritonitis en roedores (Turner et al., 2011). En nuestro experimento las inyecciones se realizaron en el cuadrante inferior derecho del abdomen para evitar inyectar en el ciego, debido a que estudios de Coria-Avila et al. (2007) describieron que las inyecciones del lado izquierdo son más propensas a dañar este segmento del intestino grueso.

En coincidencia con la técnica utilizada por otros autores, en el Modelo de Flebotomía o de Deficiencia de Hierro empleamos el método de extracción sanguínea del seno retro-orbital para inducir depleción tisular de hierro y estimular la eritropoyesis (Pak et al., 2006; Lasocki et al., 2008; Chiabrando et al., 2013; Casanovas et al., 2013; Kuzmac et al., 2014; Yien et al., 2015). En la Guía para la recolección de sangre en Animales de Laboratorio se describe que extracciones de bajos volúmenes de sangre (menor o igual al 10% del volumen de sangre circulante) no provocan anemia ni deficiencia de hierro (Thiel College Institutional Animal Care and Utilization Committee, Guidelines for Collection of Blood from Laboratory Animals). De hecho, en nuestro modelo fueron extraídos entre 20-25% del volumen de sangre total del ratón, debido a que es la menor cantidad de sangre necesaria para inducir anemia y deplecionar de hierro los tejidos. En el caso de extraer mayores volúmenes de sangre (30-40% de volumen de sangre circulante) los animales pueden sufrir shock hipovolémico y muerte (Thiel College Institutional Animal Care and Utilization Committee, Guidelines for Collection of Blood from Laboratory Animals).

Se sabe que el anestésico isoflurano permite una rápida inducción de la anestesia, así como también una rápida recuperación del animal (Fish et al., 2008). Por ello, empleamos este anestésico volátil antes de realizar la extracción sanguínea. Durante la inducción de la anestesia se evaluó la respuesta de los ratones teniendo un especial control de la

respiración y del comportamiento. Además, antes y durante el procedimiento se controló la frecuencia respiratoria, la respuesta a estímulos y los movimientos espontáneos.

Teniendo en cuenta que en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del NIH se sugiere el uso de analgesia para disminuir el dolor y el estrés del animal, se utilizaron gotas oftalmológicas específicas para inducir analgesia local durante y después de la extracción sanguínea en deficiencia de hierro y en los controles (operación simulada) (Committee on Care and Use of Laboratory Animals, 1996). Para evitar la infección periorbital y el potencial daño de la vista a largo plazo, se utilizaron tubos capilares estériles y las extracciones sanguíneas consecutivas no se realizaron en el mismo ojo.

En base a lo expuesto, se puede concluir que los procedimientos llevados a cabo en los animales de experimentación en nuestro laboratorio siguieron las normas de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del NIH (Committee on Care and Use of Laboratory Animals, 1996).

Estudios hematológicos y estado del hierro circulante en los Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro

La eficacia de nuestro moldeo para inducir sobrecarga de hierro sistémica fue confirmada por el aumento significativo del hierro circulante. Se conoce que la transferrina (Tf) es la proteína encargada de distribuir el hierro en el organismo, donde sólo el 30% se halla saturada con hierro en estados de balance de hierro (Pérez et al., 2005). El 70 % restante puede captar el exceso de hierro libre evitando su toxicidad. Sin embargo, 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). En este sentido, la elevada ferremia que detectamos en sobrecarga podría ser el resultado del aumento del hierro unido y no unido a transferrina.

En el Modelo de Deficiencia de Hierro la disminución significativa de la hemoglobina evidencia que la extracción crónica de sangre indujo anemia en los ratones flebotomizados. Se sabe que en la anemia inducida por pérdidas persistente de sangre, las reservas tisulares de hierro disminuyen produciendo un estado de deficiencia (Ganz & Nemeth, 2006). En nuestro modelo de Deficiencia de Hierro el aumento de la ferremia podría explicarse por la estimulación de la absorción duodenal de hierro y por su movilización desde los sitios de

reserva. Ambos procesos aumentarían el hierro biodisponible requerido para la eritropoyesis activa.

La estimulación eritropoyética en deficiencia de hierro fue evidenciada por el aumento significativo de los reticulocitos que observamos en circulación. Este aumento de la eritropoyesis en deficiencia de hierro es inducido por la liberación de eritropoyetina. La eritropoyetina (EPO), principal hormona reguladora de la eritropoyesis sintetizada principalmente por los fibroblastos peritubulares de la corteza renal, estimula la supervivencia, proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides (Jelkmann, 2011). La hipoxia tisular causada por la disminución de eritrocitos en nuestro modelo sería el estímulo que regula la síntesis de EPO a través de un control transcripcional mediado por el factor inducible por hipoxia, mecanismo descrito en macrófagos humanos (Elbarghati et al., 2008). El factor inducible por hipoxia (HIF) es un heterodímero compuesto por subunidades α y subunidades constitutivas β (Semenza, 2000). En normoxia, la subunidad α del HIF es hidroxilada por una proliil-hidroxilasa, siendo posteriormente ubiquitinizada y degradada en el proteosoma. En condiciones de hipoxia, este proceso es inhibido y los HIFs en forma de heterodímeros pueden unirse a los elementos de unión de HIF en el ADN, actuando como factores de transcripción (Semenza, 2000). La actividad de la enzima proliil-hidroxilasa depende del hierro, observándose que los niveles de HIF aumentan en células con bajo nivel de hierro (Metzen & Ratcliffe, 2004). Por lo tanto, se puede postular que la hipoxia o el bajo hierro podrían ser los estímulos que aumentarían la liberación de EPO, activando la eritropoyesis en nuestro Modelo de Deficiencia de Hierro.

Los estudios presentados en este capítulo nos permitieron caracterizar y optimizar los Modelos de Sobrecarga de Hierro y de Deficiencia de Hierro, que fueron los modelos biológicos utilizados para el desarrollo del Plan de Trabajo de la Tesis.

Capítulo 2

Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro.
Caracterización de las proteínas del hierro
y su regulación en hígado y duodeno

MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO

Estudios previos de nuestro laboratorio identificaron la relevancia funcional de ferroportina en la exportación del hierro en duodeno e hígado en estados de desbalance, como la hipoxia y la sobrecarga de hierro (D'Anna & Roque, 2013).

Para profundizar el conocimiento sobre la movilización del hierro en exceso evaluamos vías de importación del hierro estudiando el transportador de metales divalentes 1 (DMT1) y el transportador ZIP14 (SLC39A14).

El aumento del hierro tisular pone en evidencia que nuestro Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro fue logrado. El exceso de hierro tisular es una condición fisiopatológica presente en enfermedades de origen genético (hemocromatosis) o adquirido como la anemia de la enfermedad crónica caracterizada por altos depósitos de hierro en el sistema retículoendotelial con ferremia baja (Ganz, 2011).

Transportador de metales divalentes 1 duodenal

El transportador de metales DMT1 absorbe hierro en estado ferroso previa reducción del hierro férrico de la dieta mediada por la ferrireductasa citocromo duodenal B (DcytB), proceso que ocurre en el borde en cepillo del enterocito (Andrews, 1999). Diversos autores han descrito que la localización de DMT1 en la membrana apical de enterocitos permite la incorporación del hierro libre (no hemo) desde la dieta al interior celular (Canonne-Hergaux et al., 1999; Trinder et al., 2000; Oates et al., 2000).

La localización perinuclear de DMT1 que observamos en enterocitos y la disminución significativa de su nivel proteico, podrían explicar que en sobrecarga habría menor captación del hierro de la dieta. La disminución de DMT1 duodenal en exceso de hierro, podría ser el resultado de un mecanismo de regulación post-transcripcional mediado por el sistema IRE-IRP. Se sabe que las proteínas citoplasmáticas IRP posee elevada 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). Se han caracterizado 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 transcripto disminuyendo su traducción (Andrews, 1999). En este sentido, el elevado nivel de hierro presente en nuestro Modelo de Sobrecarga dificultaría la unión de IRPs al segmento IRE del ARNm de DMT1, lo que disminuiría su traducción en duodeno.

Estudios previos realizados por Núñez et al. (2010) observaron que DMT1 duodenal también disminuye en ratas que recibieron una dosis intragástrica de hierro. Además, estos autores describieron 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 la captación de hierro.

Prohepcidina hepática

La hepcidina, reguladora central del hierro sistémico, es sintetizada como un pre-peptido de 84 aminoácidos formado por un péptido señal, una pro-región y un péptido maduro de 25 aminoácidos (Gagliardo et al., 2009). La maduración del péptido hepcidina ocurre en el aparato de Golgi por su clivaje mediado por la enzima furina convertasa, que genera el péptido activo maduro de 25 aminoácidos liberado a la circulación (Valore & Ganz, 2008).

A partir del descubrimiento de hepcidina varios grupos han intentado desarrollar, sin demasiado éxito, ensayos para medir este péptido en los fluidos biológicos. La dificultad de desarrollar técnicas para medir hepcidina circulante, se debió a varias características de esta molécula: estructura terciaria compleja, diversas isoformas con escasa actividad biológica y por ser un péptido muy pequeño (25 aminoácidos) (Ganz, 2003). Estas características dificultaron la obtención de anticuerpos anti-hepcidina (Gutschow et al., 2015).

En el año 2008 se desarrolló un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que permite la detección de hepcidina sérica en humanos (Ganz, 2008). Sin embargo, recién en el año 2015 se describió un método de ELISA que permite la detección de hepcidina en el suero de ratones, siendo esta publicación posterior a nuestros estudios (Gutschow et al., 2015).

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).

En el mecanismo de regulación de hepcidina mediado por la saturación de transferrina (Tf) se ha descrito que los niveles elevados de transferrina diférrica (Tf-Diférrica) favorecen la interacción del complejo Fe-Tf con el RTf1, produciendo la disociación entre el RTf1 y la proteína de la hemocromatosis (HFE), para formar luego un complejo entre HFE y RTf2 (Pantapoulos, 2008). La unión del complejo HFE-RTf2 con Fe-Tf sensibilizaría al receptor de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), favoreciendo la interacción del ligando BMP6 con su receptor (RBMP) y con su co-receptor llamado hemojuvelina (HJV). Estos eventos conducirían al aumento de la transcripción del gen de hepcidina a través de la activación de una vía de señalización mediada por SMADs (Ganz & Nemeth, 2012).

Si bien se ha estudiado ampliamente la cascada de regulación del gen de hepcidina, los mecanismos moleculares por los cuales HFE y RTf2 regulan su síntesis no han sido totalmente aclarados. Un estudio reciente en células de hepatoma humano demostró que HFE también interactúa con el receptor de BMP tipo I (RBMP I) favoreciendo la estabilización de este receptor y la activación de la vía de señalización mediada por BMP-SMADs (Wu et al., 2014). Estas interacciones activarían la transcripción de hepcidina. McDonald et al. (2014) han sugerido que la unión del RTf2 con el complejo Fe-Tf aumentaría la síntesis de BMP6 que regula positivamente a hepcidina.

A partir de estos estudios Rishi et al. (2015) propusieron un modelo para la regulación de hepcidina. Postularon que la unión del complejo Fe-Tf al RTf2 aumentaría la síntesis de BMP6 que interaccionaría con su receptor RBMP I, siendo este receptor estabilizado luego de su unión con HFE que es liberada de la interacción con RTf1. Finalmente, la unión de

BMP6 a su receptor RBMP I y a su co-receptor HJV activaría una cascada de señalización dependiente de SMADs que estimula la transcripción de hepcidina.

Respecto de 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. (2015) 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).

Los estudios sobre la regulación transcripcional de hepcidina publicados entre los años 2011-2015 nos aportan una clara visión del complejo mecanismo de regulación de hepcidina, que contempla sin lugar a duda la participación de diversas vías.

En nuestro Modelo de Sobrecarga de Hierro sugerimos que tanto el aumento de la transferrina diférrica como el mayor contenido hepático de hierro, activarían distintos mecanismos regulatorios que aumentan la transcripción del gen de hepcidina.

La relación inversa entre prohepcidina hepática y DMT1 duodenal que describimos anteriormente en exceso de hierro, nos permite proponer que hepcidina actuaría en coordinación con DMT1 para controlar la captación de hierro en duodeno.

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.

Transportador de metales divalentes 1 y ZIP14 hepáticos

Es ampliamente conocido que el tejido hepático almacena elevadas cantidades de hierro en estados de sobrecarga, una condición clínica que cursa con altos niveles de hierro no unido a transferrina (NTBI) (Brissot et al., 2012). La función de los importadores DMT1 y ZIP14 ha sido asociada tanto a la captación de TBI como a la de NTBI (Zhao et al., 2010; Liuzzi et al., 2006; Garrick et al., 2003; Touret et al., 2003). Sin embargo, la participación de

estos transportadores en la captación hepática de NTBI no ha sido totalmente aclarada, porque los estudios realizados han mostrado resultados contradictorios (Shindo et al., 2006; Nam et al., 2013; Jenkitkasemwong et al., 2015). Estudios de Shindo et al. (2006) mostraron que DMT1 es el transportador responsable de la incorporación de NTBI en los hepatocitos, mientras que otros autores determinaron que ZIP14 sería un transportador esencial en esta captación (Nam et al. 2013; Jenkitkasemwong et al., 2015). Por ello, uno de nuestros objetivos fue analizar la expresión de DMT1 y ZIP14 en hígado en el Modelo de Sobrecarga de Hierro.

La elevada expresión de DMT1 en hepatocitos en sobrecarga, podría reflejar su función en la captación del hierro en exceso. Este aumento de DMT1 coincide con la regulación del transportador descrita en ratas alimentadas con una dieta rica en hierro (Trinder et al. 2000).

Estudios de Fleming et al. (1998) y de Gunshin et al. (1997) identificaron dos isoformas de DMT1, DMT1-IRE y DMT1 no IRE, que se generan por corte alternativo en el extremo 3' del ARNm. Es importante destacar que la isoforma DMT1 no IRE no es regulada post-transcripcionalmente por el hierro celular, porque no posee el segmento IRE en su ARNm (Andrews, 1999). En este sentido, el aumento de DMT1 hepático inducido por el hierro podría ser el resultado de la regulación de la isoforma no IRE de DMT1, dado que se conoce que la isoforma DMT1 IRE disminuiría en exceso de hierro porque 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 almacenamiento, 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).

De forma similar a la función que propusimos para DMT1 en hígado, el transportador ZIP14 también podría actuar en la captación hepática del hierro en exceso en nuestro Modelo de Sobrecarga, como fue previamente caracterizado por Nam et al. (2013) en ratas alimentadas con una dieta rica en hierro. Estos autores describieron que el hierro aumentó la proteína ZIP14 y no su ARNm en hígado, demostrando que ZIP14 sería regulado post-transcripcionalmente (Nam et al., 2013). 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). 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.

Ferritina hepática

Teniendo en cuenta que nuestros resultados muestran que los importadores DMT1 y ZIP14 son regulados por hierro en hígado, planificamos estudiar el almacenamiento hepático del biometal analizando la distribución de ferritina y de hemosiderina en este tejido. Los estudios mostraron que los hepatocitos y las células de Kupffer almacenan elevadas cantidades de hierro en sobrecarga, en coincidencia con los resultados descriptos previamente en nuestro laboratorio (D'Anna & Roque, 2013). Este mecanismo representaría una ventaja fisiológica para proteger al organismo de los efectos tóxicos del hierro al aumentar sus reservas tisulares. El aumento del hierro hepático confirma la conocida función del hígado como órgano de depósito (Muñoz et al., 2009).

La elevada expresión de ferritina en sobrecarga 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).

CONCLUSIONES

A partir de nuestros estudios sobre DMT1 duodenal podemos concluir que en sobrecarga de hierro su localización perinuclear en enterocitos y su menor expresión, representarían un mecanismo de ventaja fisiológica al limitar la biodisponibilidad de hierro cuando los depósitos están repletos. Esta condición puede presentarse en pacientes que cursan con elevado almacenamiento tisular de hierro, como se ha descripto en la hemocromatosis hereditaria o en pacientes con β -talasemia que presentan sobrecarga de hierro como consecuencia de las continuas transfusiones sanguíneas y de la abundante absorción

duodenal de hierro por la reducida síntesis de hepcidina (Beutler, 2006; Ganz, 2011; Olivieri & Brittenham, 2013).

En el tejido hepático, la intensa expresión de DMT1 y ZIP14 en sobrecarga de hierro sugiere una elevada tasa de captación de hierro en el hígado para aumentar su reserva como ferritina y, por este mecanismo, disminuir la toxicidad del hierro libre. Además, la molécula señal hepcidina liberada por el hígado, luego del clivaje de prohepcidina, actuaría de una manera coordinada con DMT1 duodenal para controlar la absorción del hierro de la dieta en condiciones de sobrecarga. También, hepcidina podría limitar la exportación del hierro en el hígado, debido a que se conoce que la interacción de esta hormona con ferroportina (FPN) induce la internalización y degradación del exportador FPN (Nemeth, 2004).

Finalmente, nuestros estudios muestran que en exceso de hierro existen mecanismos sistémicos y celulares que modulan la absorción duodenal del hierro de la dieta y su almacenamiento hepático mediante la regulación de la expresión de DMT1, ZIP14, ferritina y hepcidina, para disminuir el exceso de hierro libre que produce daño celular (Figura 113).

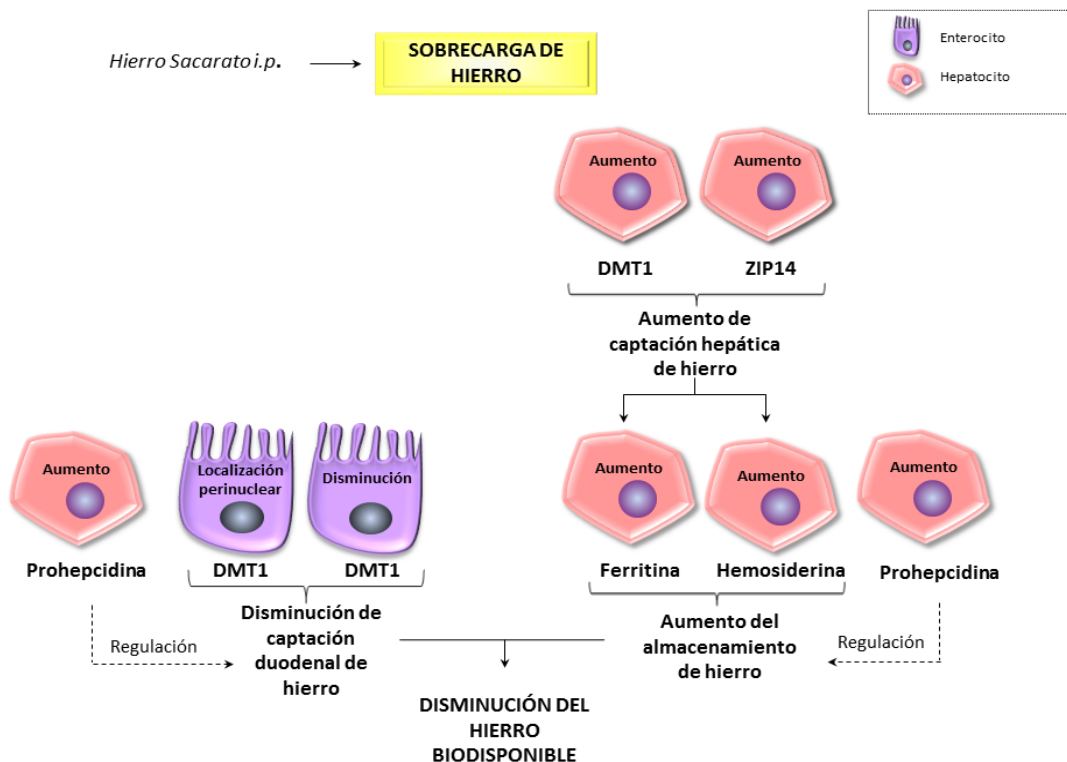


Figura 113. Vía propuesta para limitar el hierro biodisponible en Sobrecarga de Hierro. La localización perinuclear y la disminución proteica de DMT1 en enterocitos y el aumento de la marcación de ZIP14 y DMT1 en hepatocitos indican funciones específicas de DMT1 y ZIP14 para limitar la absorción duodenal de hierro y aumentar su almacenamiento hepático en sobrecarga de hierro. El aumento de Prohepcidina en hepatocitos contribuye con la regulación negativa de la absorción y liberación del hierro.

MODELO DE DEFICIENCIA DE HIERRO

El desarrollo de un Modelo Animal de Deficiencia de Hierro nos permitió avanzar en el estudio sobre la movilización del hierro en estados de desbalance. En este sentido, se estudió la expresión de proteínas claves del hierro en alta demanda inducida por la depleción del hierro de reserva, condición clínica frecuentemente observada en humanos por la anemia ferropénica (Lopez et al., 2015).

Transportador de metales divalentes 1 duodenal

La función de DMT1 duodenal en la captación del hierro no hemo de la dieta sería regulada por el bajo hierro, como se evidencia por la marcada expresión de DMT1 y su redistribución hacia la membrana apical en enterocitos en deficiencia de hierro. Estos cambios fisiológicos adaptativos permitirían estimular la absorción duodenal de hierro para restaurar el cuadro anemia. Estudios previos demostraron la localización apical de DMT1 en duodeno de ratas y ratones alimentados con una dieta pobre en hierro (Canonne-Hergaux et al., 1999; Trinder et al., 2000).

De manera similar a la hipótesis sobre la regulación de DMT1 duodenal en sobrecarga de hierro, proponemos que el sistema IRE-IRP podría ser responsable del aumento de DMT1 en deficiencia. La interacción de la proteína IRP con el segmento IRE del ARNm de DMT1 por el bajo nivel celular de hierro en deficiencia, induciría la estabilización del transcripto favoreciendo su traducción. En este sentido, se ha descrito que la unión de IRPs con IRE localizado en el extremo 3' del ARNm de DMT1 previene la degradación del transcripto por ARNasas (Andrews, 1999).

Transportador de metales divalentes 1 hepático

El hígado posee una función dual en ciclo del hierro. Cumple funciones de reserva y aporta hierro para la eritropoyesis cuando la demanda es alta (Graham et al., 2007). Aun cuando ha sido descrita la participación de DMT1 en la captación de hierro unido a transferrina en hepatocitos, su regulación hepática en la eritropoyesis activa es parcialmente comprendida (Touret et al., 2003). Estudios de Trinder et al. (2000) mostraron

una disminución de DMT1 en el hígado de ratas alimentadas con una dieta pobre en hierro, mientras que en un modelo similar Nam et al. (2013) identificaron un aumento de DMT1.

Es importante destacar que nuestros estudios aportarían claridad sobre la regulación hepática de DMT1 a partir de su expresión y localización en el hígado en un estado de alta demanda de hierro. Postulamos que la baja expresión de DMT1 en hepatocitos en deficiencia de hierro reflejaría una menor captación hepática de hierro para aumentar su biodisponibilidad. Estudios de Trinder et al. (2000) realizados en ratas alimentadas con una dieta deficiente de hierro mostraron los mismos cambios que nosotros en la expresión de DMT1 en hígado.

Para explicar la disminución de DMT1 en deficiencia de hierro sugerimos que la isoforma no IRE de DMT1 participaría en este mecanismo, dado que se conoce que la isoforma IRE de DMT1 aumenta cuando los niveles celulares de hierro son bajos como en nuestro Modelo de Deficiencia de Hierro (Andrews, 1999).

Ferritina hepática

La baja expresión de ferritina en hepatocitos avala nuestra hipótesis sobre la menor captación hepática de hierro reflejada por la disminución de DMT1. Cuando las necesidades de hierro son elevadas, el hígado tendría la función de aumentar el hierro biodisponible al limitar su depósito.

De forma similar a la regulación propuesta en exceso de hierro, el control de ferritina en deficiencia podría ser mediado por las proteínas IRPs. Se sabe que cuando el nivel celular de hierro es bajo, las proteínas IRP1 e IRP2 se activan por el desacople del *cluster* Fe-S y por la menor degradación proteosomal, respectivamente (Wallander et al., 2006). Estas proteínas activas se unen al segmento IRE localizado en el extremo 5' del ARNm de ferritina bloqueando la traducción del transcripto, lo que disminuye los niveles de la proteína (Harrison & Arosio, 1996). En este sentido, podríamos sugerir que el bajo nivel de hierro que detectamos en hígado en deficiencia activaría a las proteínas IRPs, que al unirse al segmento IRE del ARNm disminuiría la expresión de ferritina.

De acuerdo a los resultados esperables, la disminución de hemosiderina en la pulpa roja del bazo en deficiencia de hierro, refleja la conocida función esplénica en el suministro del hierro requerido para la eritropoyesis activa (Roque et al., 2008).

CONCLUSIONES

Nuestros estudios nos permiten concluir que la redistribución apical de DMT1 en enterocitos favorecería la absorción intestinal de hierro, proceso fisiológico esencial para aumentar la biodisponibilidad del hierro requerido para restaurar el eritrón. Además, la menor captación de hierro en hepatocitos reflejada por la débil expresión de DMT1 y la disminución de las reservas de hierro en hígado y en bazo, evidencian la existencia de mecanismos regulatorio presentes en los sitios de depósito que aumentan la biodisponibilidad del hierro.

Finalmente, concluimos que el tejido duodenal y hepático actúan en forma coordinada para aumentar el hierro biodisponible para satisfacer el requerimiento eritropoyético (Figura 114).

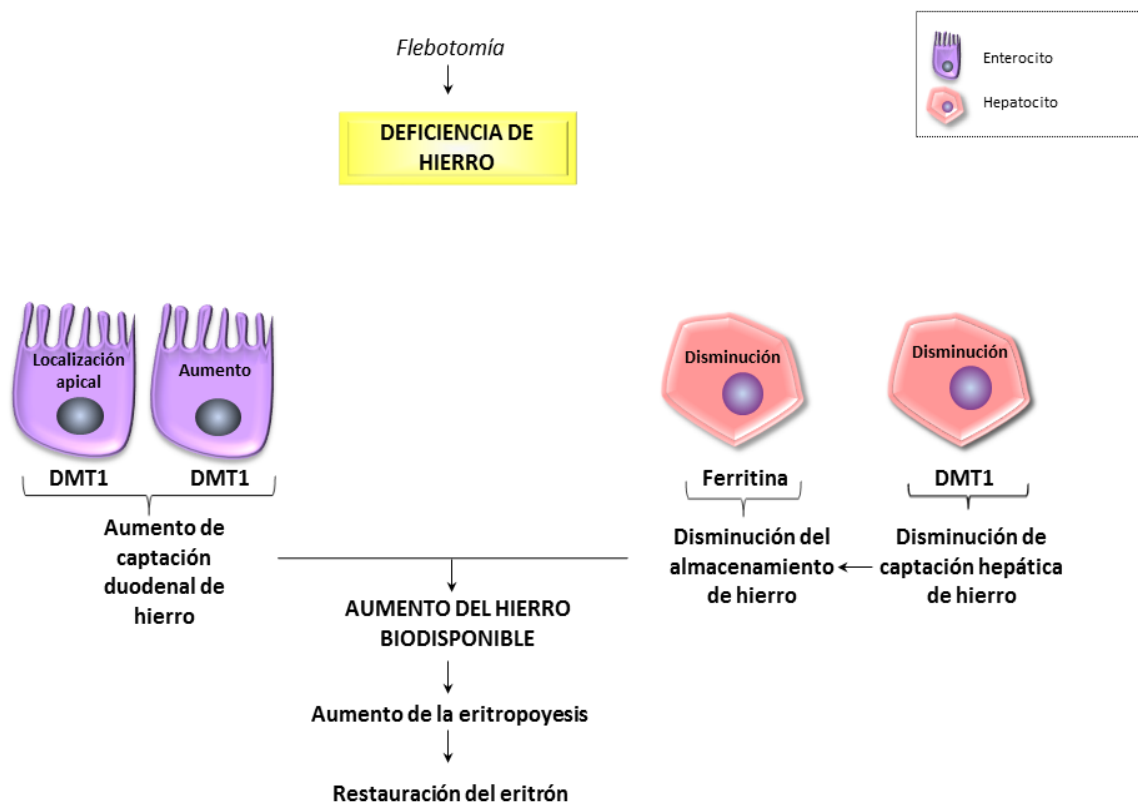


Figura 114. Vía propuesta para aumentar el hierro biodisponible en Deficiencia de Hierro. La localización apical de DMT1 en enterocitos y la disminución de su marcación en hepatocitos indican una función específica de DMT1 para aumentar la absorción duodenal de hierro y disminuir su almacenamiento hepático en deficiencia de hierro.

Capítulo 3

Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro.
Caracterización de las proteínas del hierro
y su regulación en páncreas

Se ha descrito ampliamente que la función del páncreas es alterada en patologías relacionadas con el exceso del hierro, siendo las más frecuentes la hemocromatosis y la β -talasemia (Simcox & McClain, 2013).

La forma más frecuente de hemocromatosis es originada por la mutación del gen HFE (aproximadamente un 90%), que disminuye la síntesis de hepcidina originando como consecuencia abundantes reservas tisulares de hierro (Ortiz Polo et al., 2012). En los pacientes con β -talasemia la sobrecarga de hierro se origina por las continuas transfusiones sanguíneas, a lo que suma la disminución de hepcidina por la eritropoyesis inefectiva de esta enfermedad genética (Ganz, 2011).

Se ha identificado al hierro como el agente etiológico que induce una alteración en la función pancreática endocrina por el daño oxidativo de las células β del páncreas secretoras de insulina (Simcox & McClain, 2013). No obstante estos avances, los mecanismos moleculares que median la sobrecarga de hierro pancreática se conocen parcialmente.

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.

Transportador de metales divalentes 1 pancreático

Nuestros estudios sobre la expresión de DMT1 en el islote de Langerhans del páncreas de ratón en condiciones basales, que colocaliza con DMT1 identificado en el páncreas humano por Koch et al. (2003), ponen en evidencia la participación de estas células en la homeostasis del hierro.

Un aporte novedoso de nuestros estudios fue demostrar que el exceso de hierro induce una disminución de DMT1 en las células del islote de Langerhans. Esta regulación funcional podría actuar como parte de un mecanismo regulatorio que disminuiría la captación del biometal en las células endocrinas, que limitaría el daño oxidativo mediado por hierro.

Un estudio reciente demostró que el nivel de DMT1 pancreático no cambió en ratas alimentadas con una dieta rica en hierro, que indicaría que el transportador DMT1 no sería regulado por el exceso de hierro en páncreas (Nam et al., 2013). La discrepancia con nuestros resultados podría adjudicarse a que la mayor sobrecarga de hierro de nuestro

modelo, respecto del modelo de Nam et al. (2013), induciría señales más contundentes sobre la regulación de DMT1.

Es importante notar que la disminución de las reservas de hierro que evidenciamos en las células endocrinas por la baja expresión de ferritina en sobrecarga de hierro, no se correlacionan con el alto nivel de hierro en circulación y en otros tipos celulares como hepatocitos. Teniendo en cuenta la disminución de las reservas de hierro en las células endocrinas del islote, no se puede explicar la disminución de DMT1 en estas células por el sistema IRE-IRP. Si DMT1 fuera regulada por IRP los niveles del transportador deberían aumentar, dado que el bajo hierro en las células del islote activaría a las proteínas IRP que al unirse al segmento IRE del ARNm de DMT1 aumentarían su traducción, como fue descrito en enterocitos (Andrews, 1999). Por lo tanto, un mecanismo independiente de IRPs regularía la disminución de DMT1 en el páncreas.

Prohepcidina pancreática

Considerando que los mecanismos moleculares que regulan la absorción celular del hierro en páncreas no están totalmente esclarecidos, se planteó como objetivo abordar el estudio de la expresión de prohepcidina para evaluar si la síntesis pancreática de hepcidina es regulada por hierro a través de un mecanismo similar al descrito en el hígado, donde es mediado por RTf1, RTf2, HFE y HJV (Ganz & Nemeth, 2012). 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.

La regulación de hepcidina inducida por hierro en el páncreas endocrino, ha sido evaluada en células de insulinooma de rata incubadas con hierro (Kulaksiz et al., 2008). Sin embargo, es necesario realizar estos estudios *in vivo*, dado que la regulación de hepcidina por hierro descrita en hepatocitos en cultivo por Nemeth et al. (2003), no se correlaciona con la identificada por Pigeon et al. (2001) en el hígado de ratones alimentados con una dieta enriquecida en hierro (*in vivo*), lo que sugeriría la existencia de vías regulatorias diferentes en las que podrían intervenir otros tipos celulares.

En este contexto un aporte novedoso de nuestros estudios fue demostrar una alta expresión de prohepcidina en las células endocrinas en sobrecarga, que sin duda reflejaría la participación de hepcidina en la regulación local del hierro en exceso. La respuesta regulatoria similar que demostramos en páncreas en el presente capítulo y en hígado en el capítulo 2, sugiere la existencia de un mecanismo regulatorio coordinado en estos órganos. Por lo tanto, podríamos postular que en las células del páncreas endocrino la regulación de hepcidina por hierro implicaría mecanismos regulatorios mediados por la saturación de transferrina similares a los identificados en hepatocitos.

La regulación de hepcidina por el hierro sistémico involucra la unión de la transferrina diférica (Tf-Fe) a RTf1 que produce el desplazamiento de la proteína HFE desde el RTf1 hasta el RTf2, formándose el complejo RTf2-HFE que se estabiliza por la interacción de Tf-Fe (Pantapoulos, 2008). El complejo FeTf-RTf2 aumentaría la síntesis de BMP6 que interacciona con su co-receptor HJV y con su receptor RBMP, siendo RBMP tipo I estabilizado por su interacción con la proteína HFE que se libera de la unión con el RTf1 (Rishi et al., 2015). Finalmente, la interacción de BMP6 con HJV y RBMP activa una vía de señalización intracelular en la que se fosforilan SMAD1/5/8 (pSMAD1/5/8). Esto favorecería la unión de pSMAD1/5/8 con SMAD4 formando un complejo que translocaría al núcleo y activaría la transcripción del gen de hepcidina (De Domenico et al., 2007).

Los mecanismos que propusimos para la regulación de hepcidina hepática en el capítulo 2 involucrarían el control de la hormona por el aumento de la transferrina diférica y por el alto contenido de hierro en hepatocitos. Sin embargo, en páncreas sugerimos que hepcidina sería modulada únicamente por la transferrina diférica debido a que no detectamos un aumento del hierro en las células endocrinas que expresan hepcidina. Por lo contrario vimos una disminución del hierro en estas células, no siendo probable que el aumento de hepcidina en el páncreas endocrino sea regulado por el hierro intracelular.

Como las células del islote de Langerhans liberan las hormonas para actuar en forma endocrina o paracrina, postulamos que hepcidina pancreática podría actuar localmente en la regulación del hierro en exceso, pero también en forma sistémica (endocrina). 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).

De nuestros resultados sobre la relación inversa entre prohepcidina y DMT1 en exceso de hierro, podemos sugerir 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 dado 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). Lenzen et al. (1996) demostraron que las células del islote de Langerhans de ratón son altamente sensibles al estrés oxidativo porque la expresión de la enzima antioxidante catalasa fue indetectable. Además, observaron que los niveles de superóxido dismutasa fueron bajos en el páncreas endocrino respecto del observado en otros tejidos, como hígado, riñón y pulmón (Lenzen et al., 1996).

Ferritina y hemosiderina pancreáticas

Nuestros estudios mostraron una notable expresión de ferritina en los islotes de Langerhans en balance de hierro, reflejando que estas células son el reservorio de hierro en el páncreas en condiciones basales. Los altos niveles de ferritina podrían ser generados por un elevado flujo de hierro por la alta expresión de DMT1. En coincidencia con nuestros resultados, MacDonald et al. (1994) identificaron elevados niveles basales de ferritina en el islote de Langerhans en el páncreas de ratas.

La débil expresión de ferritina y la ausencia de hemosiderina que observamos en el islote de Langerhans en sobrecarga de hierro, reflejarían una reducida importación de hierro como consecuencia de la disminución de DMT1 que describimos anteriormente en las células endocrinas. Un posible mecanismo que regularía la disminución de ferritina en las células endocrinas podría ser la activación de las proteínas IRPs inducida por el bajo hierro en el islote, ya que se ha descrito que IRPs activas se unen al segmento IRE en el ARNm de ferritina y bloquean su traducción (Wallander et al., 2006).

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 la administración de Fe^{3+} -NTA. La discrepancia con nuestro estudio puede ser debida a las distintas formas de hierro utilizadas para inducir la sobrecarga. Nuestra 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.

Nuestro análisis de ferritina en el páncreas exocrino muestra que las células del acino y del tejido conectivo participan activamente en el almacenamiento del hierro en exceso, resultados que concuerdan con los publicados en ratas alimentadas con una dieta rica en hierro carbonilo (Iancu et al., 1987).

La ausencia de DMT1 y la presencia de ferritina observadas en las células acinares, podría indicar que DMT1 no es la principal vía de captación de hierro en estas células. En este sentido, Jenkitkasemwong et al. (2015) han sugerido que el transportador ZIP14 mediaría la captación del hierro en exceso en las células acinares, en coincidencia con la función de ZIP14 que propusimos en hepatocitos.

Con respecto al estudio de la distribución del hierro en páncreas, se pone en evidencia que el exceso de hierro induce una disminución de las reservas en el islote de Langerhans, depositándose selectivamente en las células del acino y del tejido conectivo. Esta distribución del hierro en páncreas podría representar un mecanismo beneficioso para disminuir la acumulación del hierro en el páncreas endocrino, cuyas células fueron caracterizadas por su alta sensibilidad al estrés oxidativo (Lenzen et al., 1996).

La ventaja funcional que representa la disminución del depósito de hierro en el páncreas endocrino, es refutada por un estudio que sugirió que la disfunción del páncreas endocrino podría ser secundaria a la alteración de la microcirculación en la zona endocrina originada por el exceso de hierro en la zona exocrina (Iancu, 1992).

CONCLUSIONES

Podemos concluir que la homeostasis del hierro en páncreas es desregulada en exceso de hierro produciendo la sobrecarga de hierro en el páncreas exocrino con posibles consecuencias a largo plazo en el endocrino.

La coordinación funcional de DMT1 y hepcidina en los islotes de Langerhans, podría ser parte de mecanismo que regula la captación de hierro pancreático previniendo la acumulación del hierro libre en células endocrinas. La disminución de la captación de hierro como resultado de la baja expresión de DMT1 en las células endocrinas, reduciría la

expresión de ferritina. Siendo las células de reserva de hierro las acinares y las del tejido conectivo.

El ciclo del hierro en páncreas es regulado por la acción coordinada de proteínas del hierro que contribuyen a la protección del tejido pancreático endocrino al limitar el hierro libre que produce especies reactivas de oxígeno. El depósito de hierro en las células acinares y del tejido conectivo constituye una ventaja biológica de la regulación del ciclo del hierro en el páncreas (Figura 115).

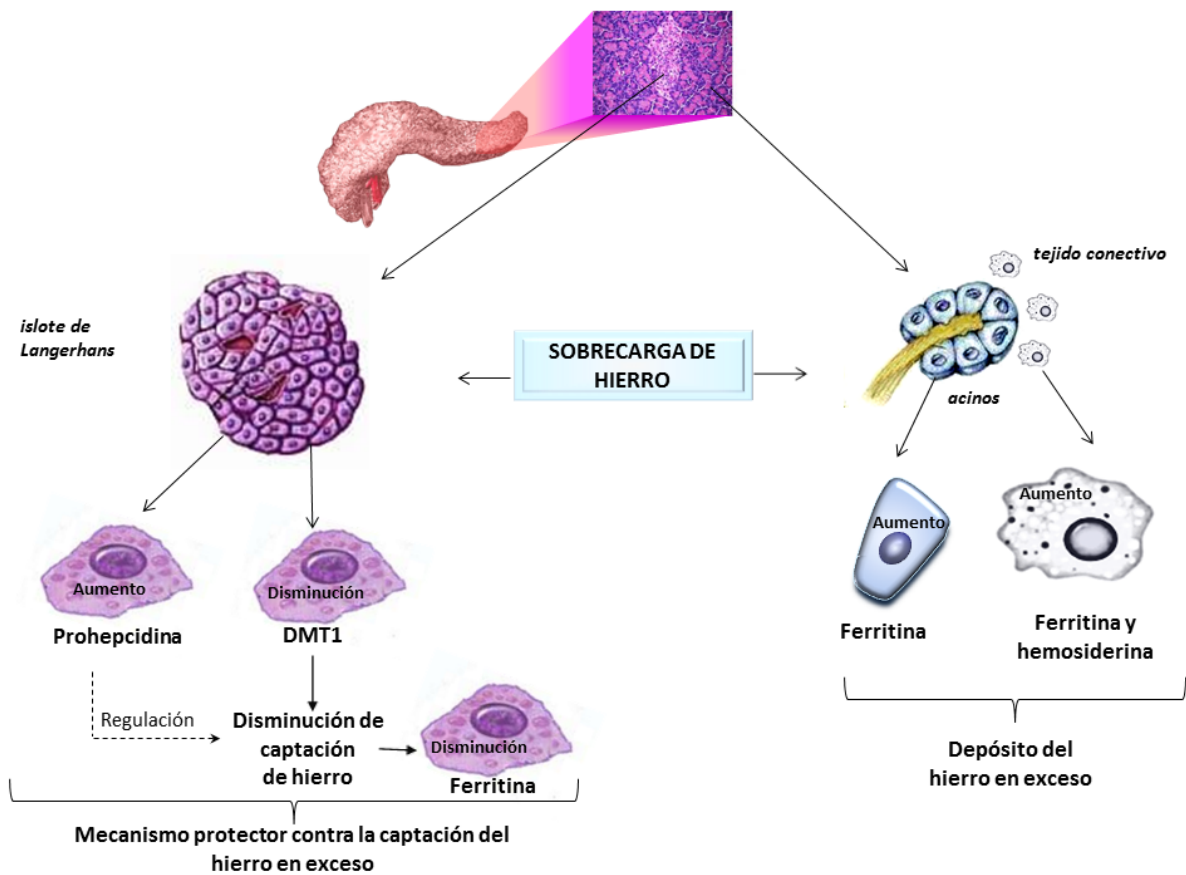


Figura 115. Vía propuesta para limitar la acumulación de hierro en el páncreas endocrino en Sobrecarga de Hierro. La disminución de la proteína DMT1 en el islote de Langerhans indica una función específica de DMT1 para limitar la captación de hierro que disminuye su acumulación en células endocrinas, aumentando el depósito de hierro en células acinares y conectivas. El aumento de prohepcidina en células endocrinas contribuiría con la regulación negativa de la captación de hierro en el islote de Langerhans.

Capítulo 4

Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro.
Caracterización de las proteínas del hierro
y su regulación en riñón

El riñón ha centrado la atención de distintos grupos de investigación con el objetivo de profundizar en el conocimiento de su relación funcional con el metabolismo del hierro (Abouhamed et al., 2006; Veuthey et al., 2008; Ikeda et al., 2013; Moulouel et al., 2013). En los últimos años la identificación de proteínas del ciclo del hierro en el tejido renal abrió interesantes expectativas para esclarecer los mecanismos que asocian la enfermedad renal con el hierro como un factor etiológico (Meyron-Holtz et al., 2004; Kulaksiz et al., 2005; Veuthey et al., 2008).

Los niveles de hierro libre intracelular aumentan cuando se altera la función renal por el daño de las células glomerulares y tubulares por diversos mecanismos (Shah et al., 2007). En los pacientes con enfermedades del riñón, los túbulos renales pueden estar expuestos a altas concentraciones de hierro debido al aumento de la filtración glomerular de hierro y de proteínas que contienen hierro, incluyendo hemoglobina, transferrina y lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (Martines et al., 2013).

Nuestra experiencia sobre la función renal y su relación con el hierro se origina por el estudio de la regulación de la expresión renal de prohepcidina, ferroportina y DMT1 en la restauración del eritrón en un modelo de ratón de anemia (Veuthey et al., 2008). Nuestros resultados demostraron que en anemia hemolítica la prohepcidina renal actúa en coordinación con ferroportina y DMT1, indicando que el riñón participa en la homeostasis del hierro (Veuthey et al., 2008).

El desarrollo de estrategias terapéuticas tendientes a reducir los niveles de hierro luminal o intracelular podrían ser el abordaje adecuado en un futuro para el tratamiento de la enfermedad renal aguda y crónica relacionada con la disfunción del hierro. En enfermedades hereditarias como la talasemia, los procesos de peroxidación lipídica son mediados por el hierro libre que produce disfunción tubular y alteración aguda de la función renal, evaluada por el aumento de creatinina sérica (Bhandari & Galanello, 2012).

Se ha descrito que en la enfermedad renal aguda hay un marcado aumento de la fracción de hierro lábil (Shah et al., 2011). Se demostró que la quelación del hierro tiene un efecto protector de la función renal asociado a una marcada reducción de los efectos tóxicos del hierro (Ikeda et al., 2013; Rajapurkar et al., 2013).

La mejor comprensión de la acción del hierro en la lesión renal y como blanco terapéutico, requiere profundizar el conocimiento de los mecanismos del metabolismo del hierro y el papel de las proteínas endógenas que participan en la quelación, la regulación y

el transporte de hierro, incluyendo la hepcidina, el receptor de transferrina 1 (RTf1), el transportador ZIP14, el transportador de metales divalentes 1 (DMT1) y la ferritina.

Los últimos avances sugieren que complejos mecanismos del metabolismo del hierro existen en el riñón modulados directa o indirectamente por el hierro celular, la inflamación y el estrés oxidativo.

MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO

El estudio del metabolismo del hierro renal y sus disfunciones en nuestro Modelo de Sobrecarga representa alteraciones estructurales y funcionales análogas a las que se desarrollan en patologías renales que cursan con mayor contenido de hierro en el filtrado glomerular y, como consecuencia, en el epitelio tubular renal.

La observación de altos niveles de ferritina y hemosiderina en los segmentos S1 y S2 del túbulo proximal nos indican que estos túbulos son los principales sitios que almacenan hierro. Por lo tanto, 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.

Receptor de transferrina 1 renal

Se conoce ampliamente que el receptor de transferrina 1 (RTf1) es una glicoproteína ubicua, que participa en la captación de hierro en diversos tejidos a través de su unión a la transferrina (Aisen, 2004). Estudios de Lu et al. (1989) identificaron al receptor de transferrina en células tubulares renales aunque su función en la dishomeostasis del hierro no ha sido claramente dilucidada.

Nuestros estudios de localización del RTf1 en riñón constituyen un aporte a esta problemática que asocia enfermedad renal con hierro porque es un transportador de hierro presente en la mayoría de las células del organismo, y por ser un regulador de la síntesis de hepcidina mediada por proteínas morfogenéticas óseas (Ganz & Nemeth, 2012). La presencia del RTf1 identificada en los túbulos proximales y en las células tubulares de la

médula interna, sugiere que estos segmentos de la nefrona participan en la captación del hierro unido a transferrina en estados de suficiencia del biometal. Otros autores han descrito que la transferrina (Tf) podría ser filtrada a través de la membrana glomerular, avalando nuestra hipótesis sobre la acción del RTf1 en el balance renal de hierro (Zhang et al., 2007; Smith & Thévenod, 2009).

En exceso de hierro la baja expresión del RTf1 que observamos en los túbulos proximales y en la médula interna, sugeriría la activación de una respuesta regulatoria tendiente a disminuir la importación del hierro en exceso. Lu et al. (1989) describieron una disminución cortical y medular del RTf1 en el riñón de ratas sobrecargadas de hierro por la administración de nitrilotriacetato férrico. Sin embargo, estos estudios difieren del nuestro en la localización del RTf1, dado que Lu et al. (1989) lo identificaron en túbulos distal en ratas con sobrecarga de hierro y nosotros en túbulos proximales en ratones con sobrecarga. La discrepancia entre la localización tubular de RTf1, puede deberse al uso de otra especie animal como la rata en lugar de ratón. En coincidencia con nuestros resultados, un estudio realizado en ratones identificó la expresión del RTf1 en el túbulo proximal renal (Zhang et al., 2007)

Podemos postular que el control post-transcripcional del RTf1 mediado por las proteínas IRPs regularía la disminución del receptor en el riñón en sobrecarga de hierro. En este sentido, la falta de unión de IRPs al segmento IRE del ARNm del RTf1 en exceso de hierro, favorece la degradación del transcripto por ARNasas disminuyendo su traducción (Muckenthaler et al., 2008).

La disminución del RTf1 por hierro no explicaría el aumento de los depósitos de hierro que observamos en las células del túbulo proximal, evidenciando que otra vía de transporte mediaría la sobrecarga renal.

Transportador de metales divalentes 1 renal

El transportador DMT1 podría participar de la captación celular del exceso de hierro, debido a que los estudios de Ferguson et al. (2001) lo identificaron en el tejido renal.

En coincidencia con los datos publicados en la literatura, nuestros resultados que identifican la localización intracelular de DMT1 principalmente en el túbulo proximal, reflejarían la participación de este importador en la movilización de hierro para mantener

su equilibrio celular en riñón (Abouhamed et al. 2006). Estos resultados fueron descritos por otros autores, quienes también identificaron la expresión de DMT1 en túbulos proximales (Gunshin et al., 1997; Canonne-Hergaux & Gros, 2002). Además, la distribución intracelular de DMT1 en la médula renal que observamos en balance de hierro sería avalada por un estudio de Ferguson et al. (2001) que identificó la expresión de DMT1 en el asa de Henle y en el conducto colector de ratas en condiciones basales.

Abouhamed et al. (2006) caracterizaron la localización de DMT1 en endosomas tardíos en células tubulares proximales de rata y describieron su colocalización con la transferrina (Tf) en células renales. Por lo tanto, dada la localización intracelular de DMT1 que detectamos en las células tubulares proximales y de la médula interna en condiciones basales, podríamos sugerir la participación de DMT1 en la captación del hierro unido a transferrina contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis del hierro en el riñón.

En coincidencia con un estudio realizado en ratas alimentadas con una dieta rica en hierro, nuestros resultados también muestran una disminución de DMT1 en los túbulos proximales en exceso de hierro, lo que evidenciaría una menor captación de este biometal en la corteza renal (Wareing et al., 2003). Asimismo, la leve disminución de DMT1 inducida por hierro que identificamos en la médula interna, sugiere que la captación renal de hierro mediada por DMT1 es controlada mayoritariamente en la corteza renal y, en menor medida, en la médula.

La disminución de DMT1 en los segmentos S2 del túbulo proximal y en la médula interna en exceso de hierro, podríamos explicarla 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).

La regulación de DMT1 por hierro puede ser interpretada como una vía regulatoria para limitar la captación renal de hierro en sobrecarga. En este mecanismo regulatorio, DMT1 actuaría en coordinación con RTf1.

Postulamos que la disminución de DMT1 y RTf1 y el aumento de las reservas de hierro en las células proximales en sobrecarga pondrían en evidencia la posible participación de transportadores diferentes a los descritos, DMT1 y RTf1, en la captación del hierro en exceso.

ZIP14 renal

El transportador ZIP14 centró nuestra atención dado que en la literatura se lo ha identificado como un transportador muy eficiente del hierro libre cuando se excede la capacidad de saturación de transferrina (Liuzzi et al., 2006). Además, trabajos más actuales de Knutson y colaboradores, han 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). Los avances realizados en la función de ZIP14 en el ciclo del hierro en diversos tejidos no han sido suficientes para aclarar su actividad en el riñón.

De nuestros resultados sobre la localización apical de ZIP14 en las células de los túbulos proximales y de la médula externa en estado de suficiencia de hierro, surge que ZIP14 participaría en la captación del hierro libre del ultrafiltrado glomerular en balance de hierro. 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).

Hasta el presente la regulación de ZIP14 en riñón en estados de desbalance del hierro no es totalmente clara. Posiblemente puede deberse a que el estudio de ZIP14 en el riñón se ha centrado en su actividad como proteína transportadora de Cd^{2+} y Mn^{2+} (He et al., 2009; Fujishiro et al., 2012). Por lo tanto, un aporte novedoso de nuestro trabajo fue demostrar un aumento de ZIP14 inducido por hierro en el túbulo proximal que reflejaría claramente una regulación de ZIP14 dependiente del hierro en riñón.

Otro aporte de nuestros estudios es que el aumento cortical de ZIP14 evidencia su función en la captación del hierro en exceso, en coincidencia con la actividad de ZIP14 descrita en el hígado de ratas alimentadas con una dieta enriquecida en hierro (Nam et al., 2013). 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.

Prohepcidina renal

Nuestro estudio sobre la distribución tisular de prohepcidina renal en condiciones basales muestra que tanto el segmento S2 del túbulo proximal como la médula interna, participan en la regulación de la homeostasis renal del hierro, como fue sugerido previamente en estudios de nuestro laboratorio (Veuthey et al. 2008).

Un aporte novedoso es la función de hepcidina renal sobre el hierro en exceso. Considerando que en el riñón identificamos una mayor expresión de prohepcidina en sobrecarga de hierro, que también describimos en hígado, postulamos la existencia de un mecanismo regulatorio común en ambos tejidos. Una hipótesis atractiva 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.

Respecto de la regulación del gen de hepcidina por la saturación de transferrina, se sabe 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).

Se ha descrito que los niveles de hierro intracelular también regulan la expresión de hepcidina, a través del aumento de la síntesis de BMP6 inducido por el exceso de hierro (Kautz et al., 2008). Posteriormente, la interacción de BMP6 con HJV y con RBMP activan la vía regulatoria mediada por SMADs que aumenta la transcripción del gen de hepcidina (Ramos E. et al., 2011). Otra vía que controlaría la expresión de hepcidina por los niveles intracelulares de hierro involucra la interacción de BMP6 con un complejo preformado de receptores de BMP tipo I y tipo II que activan la cascada intracelular de SMADs (Latour et al., 2015).

Considerando que nuestro Modelo de Sobrecarga de Hierro cursa con aumento de la saturación de transferrina y del hierro en células del túbulo proximal, sugerimos que ambos

estímulos regularían la transcripción del gen de hepcidina aumentando la expresión de prohepcidina y de hepcidina en las células tubulares proximales.

Postulamos que el aumento de hepcidina y la disminución de DMT1 que observamos en riñón podrían reflejar una función moduladora negativa de hepcidina sobre la captación renal de hierro para limitar su importación. Estudios realizados en células renales de ratón *knock-out* para hepcidina tratadas con hepcidina exógena observaron, en coincidencia con nuestra hipótesis, que hepcidina regularía negativamente a DMT1 (Moulouel et al., 2013).

CONCLUSIONES

De acuerdo con lo descrito previamente en la literatura, 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 (Veuthey et al., 2008)

La disminución en la expresión de DMT1 y de RTf1 en los túbulos proximales y en la médula interna en sobrecarga de hierro podría ser un mecanismo que intenta limitar la captación del hierro en exceso. Sin embargo, el aumento de hemosiderina y ferritina muestran claramente que las células epiteliales del túbulo proximal se encuentran sobrecargadas de hierro. En este sentido, el aumento 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.

Nuestros estudios también muestran una relación inversa entre prohepcidina y DMT1 en sobrecarga, que evidenciaría una acción coordinada de hepcidina renal con el importador DMT1 para controlar la importación de hierro.

Finalmente podemos concluir que en exceso de hierro, a pesar de la ventaja fisiológica que muestra la disminución de DMT1 y RTf1, se favorecería la captación de hierro renal a través de ZIP14, aumentando de esta forma el hierro libre que es tóxico para células y tejidos (Figura 116).

Discusión

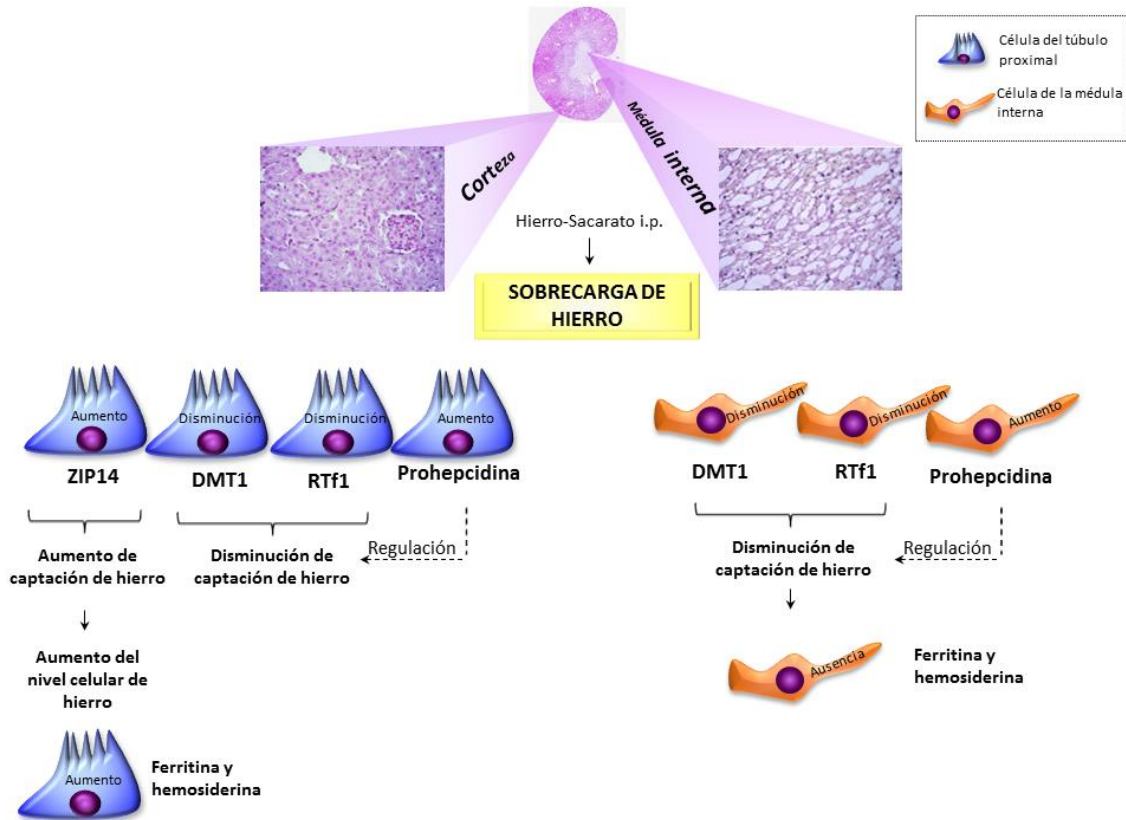


Figura 116. Panel izquierdo: Vía propuesta para aumentar la acumulación de hierro en la corteza renal en Sobrecarga de Hierro. El aumento de la proteína ZIP14, la disminución de RTf1 y de DMT1 y la localización apical de ZIP14 en células del túbulo proximal indican una función específica de ZIP14 para captar el hierro en exceso produciendo la sobrecarga de hierro renal. El aumento de prohepcidina en las células del túbulo proximal contribuiría a la regulación de la captación renal de hierro. **Panel derecho: Vía propuesta para limitar la acumulación de hierro en la médula interna renal en Sobrecarga de Hierro.** La disminución de DMT1 y de RTf1 en las células de la médula interna renal indican funciones específicas de RTf1 y DMT1 para limitar la captación del exceso de hierro. El aumento de prohepcidina en las células de la médula renal interna contribuiría a la regulación de la captación de hierro.

MODELO DE DEFICIENCIA DE HIERRO

En el organismo, la biodisponibilidad del hierro está bajo un estricto control de una red de proteínas que lo movilizan y almacenan, donde la hepcidina es el principal regulador (Muñoz et al., 2009). Se sabe que cuando la demanda de hierro es elevada, los bajos niveles de hepcidina permiten una mayor absorción duodenal de hierro y su liberación desde los sitios de reserva como los macrófagos del sistema retículoendotelial (Ganz, 2011).

Estudios de nuestro laboratorio y de otros grupos sugirieron que el riñón también participaría en el control del hierro biodisponible mediante la regulación de la pérdida urinaria de hierro (Abouhamed et al., 2006; Wareing et al., 2003; Veuthey et al., 2008). Por ello, nos propusimos estudiar el ciclo del hierro en el riñón en un estado de desbalance que cursa con un alto requerimiento celular y sistémico de hierro, como representa nuestro Modelo de Deficiencia de Hierro.

Receptor de transferrina 1 renal

Se conoce que el hierro transportado por la transferrina (Tf) ingresa a las células a través de un proceso de endocitosis mediado por el receptor de transferrina 1 (RTf1), glicoproteína homodimérica transmembrana cuyos monómeros se encuentran unidos entre sí por dos puentes disulfuro (Pérez et al., 2005). En la mayoría de las células la captación del hierro unido a transferrina es modulada por la expresión del RTf1 en la membrana celular (Aisen, 2004).

La presencia del RTf1 que observamos en la membrana apical en las células del túbulo proximal y de los túbulos medulares en deficiencia de hierro, sugiere que este receptor tendría una función fisiológica relevante en la reabsorción renal de hierro para restaurar el eritrón. La redistribución del RTf1 hacia la membrana apical de las células tubulares proximales en deficiencia de hierro, respecto de la localización citoplasmática observada en control, constituye un aporte novedoso dado que no había sido descrito previamente cambios en la localización celular del RTf1 en el riñón. En la bibliografía existen datos que muestran únicamente el aumento del RTf1 en la corteza y en la médula renal en ratas alimentadas con una dieta deficiente de hierro (Lu et al. 1989).

A diferencia de nuestros resultados que muestran la expresión del RTf1 en el túbulo proximal en el riñón de ratones con deficiencia de hierro y en los controles, Lu et al., (1989)

identificaron la expresión del RTf1 en el túbulo distal renal de ratas control y con deficiencia de hierro. Estas diferencias podrían ser debidas a las distintas especies empleadas, dado que un estudio realizado en ratones por Zhang et al. (2007) detectaron la expresión del RTf1 en el túbulo proximal renal, en coincidencia con nuestros resultados.

El aumento del RTf1 que observamos en el túbulo proximal en deficiencia de hierro podríamos explicarlo por la regulación de su traducción mediada por la proteína reguladora del hierro (IRP). Se sabe que esta regulación post-transcripcional aumenta la expresión del RTf1 mediante la activación, por el bajo hierro, de las proteínas citosólicas IRPs que se unen al segmento IRE en el extremo 3' del ARNm del RTf1. Esta interacción aumenta la estabilidad del transcripto del receptor al protegerlo de la degradación mediada por ARNasas (Wilkinson & Pantopoulos, 2014). Otra posible explicación para el aumento de RTf1 involucraría una regulación transcripcional mediada por el factor inducible por hipoxia (HIF), debido a que HIF es regulado en células con deficiencia de hierro y a que el promotor del gen del RTf contiene elementos de respuesta a HIF (Lok & Ponka, 1999; Metzen & Ratcliffe, 2004).

Transportador de metales divalentes 1 renal

En estudios previos de nuestro laboratorio se demostró que 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 et al., 2008).

Nuestras evidencias experimentales actuales muestran que la deficiencia de hierro indujo una redistribución de DMT1 hacia el citoplasma cercano a la membrana apical en células epiteliales de los segmentos S2 y S3 del túbulo proximal, respecto de la distribución homogénea identificada en condiciones basales. Este cambio en la localización de DMT1 en la corteza renal evidencia la relevancia funcional de este importador en la captación de hierro desde el ultrafiltrado glomerular para satisfacer la alta demanda de hierro sistémica y del tejido renal. Otros autores han sugerido también que, cuando la necesidad de hierro es elevada, la modulación de DMT1 renal puede ser un proceso que le permite al organismo conservar hierro (Martines et al., 2013).

A diferencia de nuestros estudios que no muestran cambios evidentes en el contenido proteico de DMT1, Canonne-Hergaux & Gros (2002) demostraron el aumento de DMT1

renal en ratones alimentados con una dieta deficiente en hierro. Posiblemente en nuestro modelo la redistribución apical de DMT1 fue suficiente para aumentar la captación de hierro, sin la necesidad de aumentar la proteína.

La zona cortical renal participaría en forma más preponderante en la captación de hierro que la zona medular, como demostramos por los cambios regulatorios de DMT1 más notorios en los túbulos proximales respecto de los túbulos de la médula interna. En este sentido, un estudio de Wareing et al. (2003) sugirió que el aumento de la captación renal de hierro en ratas alimentadas con una dieta pobre en hierro, sería el resultado de la regulación de DMT1 en la corteza renal.

Prohepcidina renal

Sin duda, nuestros estudios muestran una regulación renal de las proteínas involucradas en la movilización celular del hierro en deficiencia. La regulación de hepcidina renal por los bajos niveles de hierro fue evidenciada por la disminución de prohepcidina en las células tubulares del segmento S2 del túbulo proximal y de la médula interna en deficiencia de hierro.

La disminución de hepcidina en riñón en los ratones con deficiencia de hierro, coincide con los cambios descritos por Nicolas et al. (2002) en el hígado de ratones flebotomizados. Podemos postular que la síntesis de hepcidina en ambos tejidos sería regulada por mecanismos moleculares similares en un estado de alta demanda de hierro.

Se ha descrito recientemente que la eritropoyetina liberada en la anemia regula negativamente la transcripción de hepcidina en el hígado (Gammella et al., 2015). Esta regulación sería mediada por vías indirectas que involucrarían la síntesis del regulador eritroide ERFE (*erythroid factor erythroferrone*) en eritroblastos que inhibe la transcripción del gen de hepcidina (Gammella et al., 2015). En base a esta regulación podríamos postular que en deficiencia de hierro aumentarían los niveles de EPO por hipoxia, regulando negativamente la transcripción del gen de hepcidina.

La disminución de prohepcidina que observamos en deficiencia de hierro en los túbulos proximales y en la médula interna, sería avalada por estudios previos de nuestro laboratorio que demostraron disminución de prohepcidina renal en ratones con anemia hemolítica, un estado de alta demanda de hierro (Veuthey et al., 2008). Esta disminución del pro-péptido

en deficiencia reflejaría la función local de prohepcidina en el tejido renal. Hecpidina renal podría actuar en coordinación con DMT1 en las células del segmento S2 y de la médula interna para controlar la reabsorción renal de hierro. La relación entre hepcidina y DMT1 que proponemos encuentra asidero en estudios que describieron la estabilización de DMT1 renal en ratones *knock-out* para hepcidina (Moulouel et al., 2013).

CONCLUSIONES

Se sabe que en deficiencia de hierro se produce un aumento de la eritropoyesis mediada por la liberación de EPO (Roque et al., 2001). En este estado, existe un acción coordinada entre la absorción duodenal de hierro y su liberación desde los sitios de depósitos, para aumentar el hierro biodisponible (Ganz, 2011).

En riñón, nuestros resultados muestran que existiría un mecanismo regulatorio que limitaría la pérdida de hierro por orina y aumentaría la biodisponibilidad del hierro requerido por la eritropoyesis activa. En este mecanismo, la localización apical de DMT1 y de RTf1 en túbulos proximales junto con la alta expresión citoplasmática de DMT1 y la localización apical de RTf1 en la médula interna, favorecerían la reabsorción de hierro desde el ultrafiltrado glomerular aumentando el hierro requerido por el tejido renal y por la eritropoyesis activa. Además, la regulación de la síntesis local de hepcidina podría contribuir a la regulación de la reabsorción del hierro en el tejido renal a través de su acción coordinada con DMT1.

Finalmente, podemos concluir que la acción coordinada de hepcidina con DMT1 y RTf1 favorecería la reabsorción de hierro desde el ultrafiltrado glomerular cuando la demanda eritropoyética de hierro es alta. Este mecanismo, suministraría el hierro requerido por las células renales y, también, podría contribuir con el mantenimiento de la homeostasis de hierro en el organismo (Figura 117).

Discusión

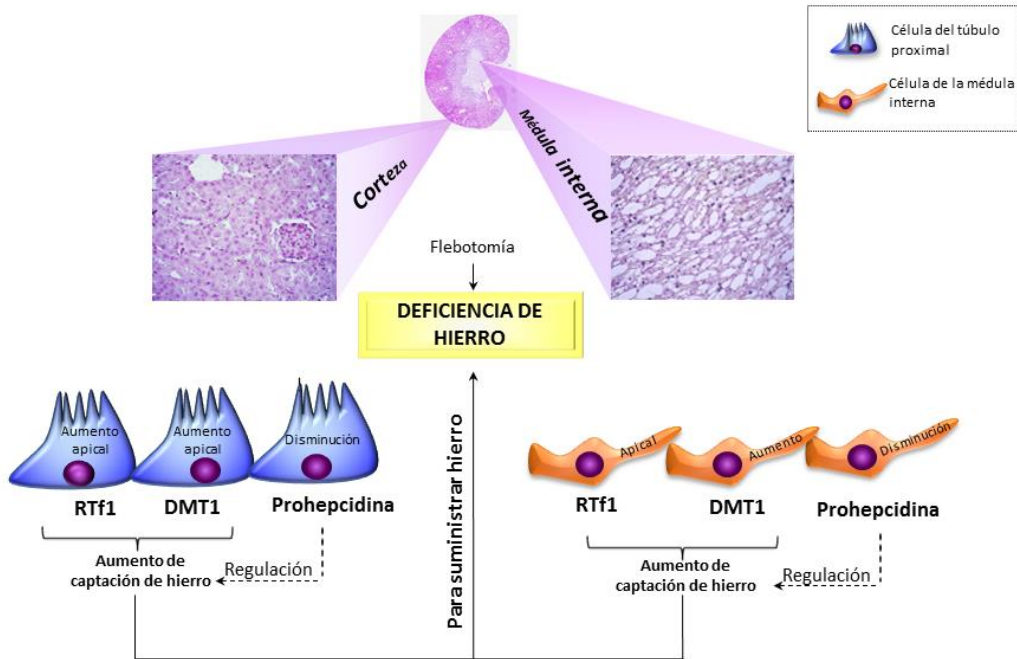


Figura 117. Panel izquierdo: Vía propuesta para aumentar la captación de hierro en la corteza renal en Deficiencia de Hierro. La localización apical de DMT1 y RTf1 y el aumento de su marcación en las células tubulares proximales indican funciones específicas de ambas proteínas para captar hierro en la corteza renal. La disminución de prohepcidina en las células del túbulo proximal contribuiría a la regulación de la captación de hierro. **Panel derecho: Vía propuesta para aumentar la captación de hierro en la médula interna renal en Deficiencia de Hierro.** El aumento de la marcación de DMT1 y la localización apical de RTf1 en las células tubulares de la médula interna indican funciones específicas de ambas proteínas en la captación de hierro en la médula interna. La disminución de prohepcidina en las células de la médula renal interna contribuiría a la regulación de la captación de hierro.

Capítulo 5

Modelos Animales de Sobrecarga y de Deficiencia de Hierro.
Caracterización de las proteínas del hierro
y su regulación en pulmón

El hierro es el metal que se encuentra en mayor abundancia en casi todos los ambientes atmosféricos (Schroeder et al, 1987). Dado que el pulmón ofrece una extensa interface con el medio ambiente, se deduce que está expuesto continuamente a partículas transportadas por el aire que contienen hierro libre en estado férrico (Ghio, 2009). La respiración humana a un ritmo normal puede exponer a los pulmones a aproximadamente 10 µg de hierro por día (Ghio, 2009).

Debido a la continua exposición del pulmón al hierro y al oxígeno, la producción de especies reactivas del oxígeno causa daño oxidativo en las células pulmonares (Ghio et al., 2006). La toxicidad del hierro está implicada en la patogénesis de diversas enfermedades pulmonares, que incluyen neumonía, fibrosis quística e inflamación pulmonar inducida por cigarrillo, radiación, quimioterapia y polvos minerales tóxicos (Ghio, 2009). Por otro lado, se ha identificado que la deficiencia de hierro es un estado clínico que agrava algunas patologías del pulmón, como fue observado en la inflamación pulmonar alérgica y en la hipertensión pulmonar (Smith et al., 2009; Rhodes et al., 2011; Brigham et al, 2015)

Sin duda, la existencia de mecanismos de protección contra el daño oxidativo inducido por hierro son necesarios para mantener la homeostasis pulmonar y proteger a los pulmones del hierro catalíticamente activo que puede causar daño oxidativo. Por ello, en el presente capítulo abordamos el estudio del metabolismo del hierro en el pulmón en modelos animales que presentan dishomeostasis del hierro.

MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO

Nuestro Modelo de Sobrecarga de Hierro con aumento de la reserva pulmonar de hierro se desarrolló para disponer de una condición clínica análoga a la que se presenta en enfermedades del pulmón (Ghio, 2009). El estudio de las bases celulares y moleculares del transporte del hierro en este modelo, podría sugerir enfoques preventivos y terapéuticos para reducir la afección pulmonar relacionada con la dishomeostasis del hierro.

ZIP14 pulmonar

Se ha descrito que el transportador ZIP14 es capaz de mediar la captación de diversos metales divalentes de importancia nutricional, como el hierro (Jenkitkasemwong et al., 2012). 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).

Un aporte novedoso de nuestro estudio fue identificar la localización intracelular de ZIP14 en las células bronquiales, porque hasta el presente solo se había identificado la presencia del ARNm de ZIP14 en muestras humanas de tejido pulmonar (Wang C. Y. et al., 2012). El aumento de ZIP14 inducido por hierro que detectamos en las células bronquiales evidencia una respuesta fisiológica originada por el exceso de hierro pulmonar, que podría ser parte de un mecanismo homeostático para captar el hierro libre tóxico.

El alto nivel de ZIP14 localizado en el citoplasma de las células bronquiales favorecería la movilización intracelular del hierro en un estado de sobrecarga. Esta función intracelular de ZIP14 en exceso de hierro fue previamente sugerida en células acinares pancreáticas en ratas alimentadas con una dieta enriquecida en hierro (Nam et al., 2013).

Los mecanismos que regulan la expresión del transportador ZIP14 en exceso de hierro no han sido totalmente aclarados. Se ha descrito que el hierro aumentaría los niveles de ZIP14 mediante una regulación post-transcripcional en el hígado y el páncreas de ratas alimentadas con una dieta enriquecida en hierro (Nam et al., 2013). La regulación post-transcripcional de las proteínas del ciclo del hierro es mediada por las proteínas IRPs que se unen a elementos de respuesta de hierro (IRE) situados en ARNm de las proteínas, como ferritina, DMT1 y RTf1 (Muckenthaler et al., 2008). Sin embargo, el ARNm de ZIP14 no posee elementos IRE y, por lo tanto, no es 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 puede incluir la inhibición de la traducción, la represión de la traducción por micro ARN y la regulación de la localización de su ARNm.

Transportador de metales divalentes 1 pulmonar

DMT1 fue el primer importador de hierro identificado en mamíferos, cuya función ha sido ampliamente estudiada en el tejido duodenal (Andrews, 1999). Sin embargo, su función en la captación pulmonar de hierro no ha sido totalmente aclarada, porque los estudios realizados han mostrado diferentes resultados. Algunos autores hallaron un aumento del nivel proteico y del ARNm de DMT1 no IRE en células bronquiales BEAS-2B expuestas a

hierro y en el pulmón de ratones hipotransferrinémicos que presentan alto depósito tisular de hierro (Wang et al., 2002; Ghio et al. 2003). Thompson et al. (2006) demostraron que el ARNm de DMT1 no se modificó en el epitelio pulmonar en ratas alimentadas con una dieta rica en hierro. Por lo tanto, la regulación de DMT1 en pulmón parecería depender del tipo de estímulo y del modelo experimental empleado.

En este contexto nuestro estudio sobre la expresión e inmunolocalización de DMT1 constituye un aporte adicional para intentar comprender la regulación pulmonar de DMT1 en exceso de hierro. La localización apical de DMT1 en células bronquiales observada en exceso de hierro aumentaría el flujo de hierro hacia el interior celular, reflejando una función de DMT1 pulmonar similar a la descrita por Wang et al. (2002) en células bronquiales y por Ghio et al. (2003) en ratones hipotransferrinémicos.

A diferencia de otros estudios que detectaron que el hierro indujo un aumento de los niveles proteicos de DMT1, específicamente de la isoforma no IRE, nuestros resultados no mostraron cambios en el nivel de la proteína DMT1 en sobrecarga de hierro (Wang et al., 2002; Ghio et al., 2003). Es importante aclarar que el anticuerpo que empleamos para analizar DMT1 detecta ambas isoformas, IRE y no IRE. Dado que Ghio et al. (2003) describieron un aumento de DMT1 no IRE y una disminución de DMT1 IRE en ratones hipotransferrinémicos que desarrollan sobrecarga de hierro pulmonar, es lógico pensar que esta regulación diferencial de las isoformas de DMT1 explicaría la ausencia de cambios en la detección total de DMT1 en nuestro estudio.

Considerando que detectamos cambios en la localización de DMT1 pero no en su nivel proteico, podemos sugerir que la migración de DMT1 desde el citoplasma hacia la membrana apical fue suficiente para lograr la captación del exceso de hierro, sin la necesidad de aumentar el nivel de la proteína.

Receptor de transferrina 1 pulmonar

La captación de hierro unido a transferrina mediada por el RTf1 es la principal fuente de hierro para el tejido pulmonar (Heilig et al., 2006). Por lo tanto, el estudio de la expresión del RTf1 en el pulmón en balance y desbalance de hierro fue importante para comprender la movilización del hierro pulmonar con una visión integrativa de las distintas vías de captación de hierro. Nuestros estudios sobre la expresión del RTf1 no muestran cambios en su nivel

proteico en sobrecarga, sugiriendo que este receptor no participa activamente en la movilización celular del exceso de hierro en el pulmón.

En coincidencia con nuestros resultados del RTf1, Heilig et al. (2006) demostraron que el nivel proteico de RTf1 no cambió en ratas con sobrecarga de hierro pulmonar inducida por instilación intratraqueal de óxido de hierro. Sin embargo, ellos observaron un aumento del ARNm del RTf1 en las ratas con sobrecarga, lo que sugiere una estimulación de la transcripción del gen de RTf1 mediada por hierro (Heilig et al., 2006). Una posible explicación sobre los eventos celulares que regulan la expresión del RTf1 pulmonar en exceso de hierro, es que la falta de cambios en la proteína RTf1 podría ser el resultado de un balance regulatorio entre el aumento de la transcripción observado por Heilig et al. (2006) y la menor traducción proteica mediada por el sistema IRE-IRP. En este sistema regulatorio IRE-IRP, las proteínas IRPs inactivas por el exceso de hierro no se unen a los elementos IRE localizados en el extremo 3' del ARNm del RTf1, produciendo la desestabilización del transcripto lo que disminuye su traducción (Muckenthaler et al., 2008).

Ferroportina pulmonar

Ferroportina (FPN) es la única proteína exportadora de hierro descrita hasta el presente (Ganz & Nemeth, 2006). En concordancia con la localización pulmonar de FPN caracterizada por Yang et al. (2005) en ratones en condiciones basales, en nuestros estudios también observamos la expresión de FPN en las células bronquiales y en los macrófagos alveolares en balance de hierro. También identificamos que las células bronquiales respondieron al exceso de hierro aumentando la expresión de FPN, reforzando las evidencias disponibles en la literatura sobre la regulación pulmonar del exportador en exceso de hierro (Yang et al., 2002).

La expresión de FPN es regulada post-transcripcionalmente por las proteínas IRPs que se inactivan cuando el hierro celular es elevado, perdiendo su capacidad de unión al segmento IRE del ARNm de las proteínas del hierro (Ward & Kaplan, 2012). El ARNm de FPN posee estos elementos IRE ubicados en el extremo 5', lo que permite su traducción cuando IRP no se encuentra unido a IRE (Ward & Kaplan, 2012). En este sentido, el aumento de FPN en las células bronquiales en sobrecarga, podría ser el resultado de la regulación post-transcripcional mediada por IRPs.

En macrófagos alveolares la ausencia de cambios de FPN es consistente con la función de estas células en el almacenamiento de hierro descrito en otros tejidos (Graham et al., 2007).

Ferritina pulmonar

Luego de confirmar que nuestro Modelo de Sobrecarga del Hierro presenta cambios regulatorios de los transportadores de hierro en pulmón, nos propusimos abordar el estudio de la proteína encargada de almacenar el hierro, la ferritina.

En células bronquiales la sobrecarga de hierro indujo una evidente 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). 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).

Prohepcidina pulmonar

La presencia de prohepcidina que identificamos en las células bronquiales y en los macrófagos alveolares en condiciones basales nos plantea un nuevo interrogante sobre la función de hepcidina pulmonar en la regulación del ciclo de hierro en este tejido.

Nguyen et al. (2006) han descrito la falta de regulación de hepcidina por hierro en cultivo primario de macrófagos alveolares. Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios de la regulación de hepcidina pulmonar por hierro en modelos *in vivo*. Por ello, una importante contribución de nuestros estudios fue demostrar que la expresión de prohepcidina no cambió en células bronquiales y en macrófagos alveolares en sobrecarga de hierro, mostrando que la síntesis de hepcidina no sería regulada por hierro en el pulmón. Postulamos que hepcidina pulmonar podría no participar en la regulación de la movilización del exceso de hierro en pulmón.

En coincidencia con nuestra hipótesis, estudios recientes 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 (Frazier et al., 2011). La actividad de hepcidina en la defensa contra enfermedades infecciosas fue identificada por sus propiedades microbicidas contra diversos microorganismos que fueron demostradas en estudios *in vitro* (Michels et al., 2015).

CONCLUSIONES

La regulación de las proteínas del ciclo del hierro en el pulmón muestra que en sobrecarga de hierro los importadores DMT1 y ZIP14 participarían en la captación del hierro en exceso en las células bronquiales. Luego de esta etapa, el hierro incorporado puede ser exportado por la FPN o almacenando en la ferritina, para disminuir la toxicidad tisular producida por el hierro libre. Otro mecanismo de detoxificación presente en este tejido, podría estar asociado con la liberación de ferritina a través de la membrana apical de las células bronquiales.

A diferencia de lo observado en hígado, riñón y páncreas, nuestros estudios en pulmón muestran que prohepcidina no sería regulada por el exceso de hierro, sugiriendo que la síntesis pulmonar de hepcidina no participaría en la regulación de las vías de importación y de exportación de hierro en sobrecarga en este tejido.

Finalmente, podemos concluir que en pulmón existe una respuesta regulatoria coordinada de los procesos de importación, exportación y almacenamiento de hierro, para evitar los efectos perjudiciales del hierro libre (Figura 118).

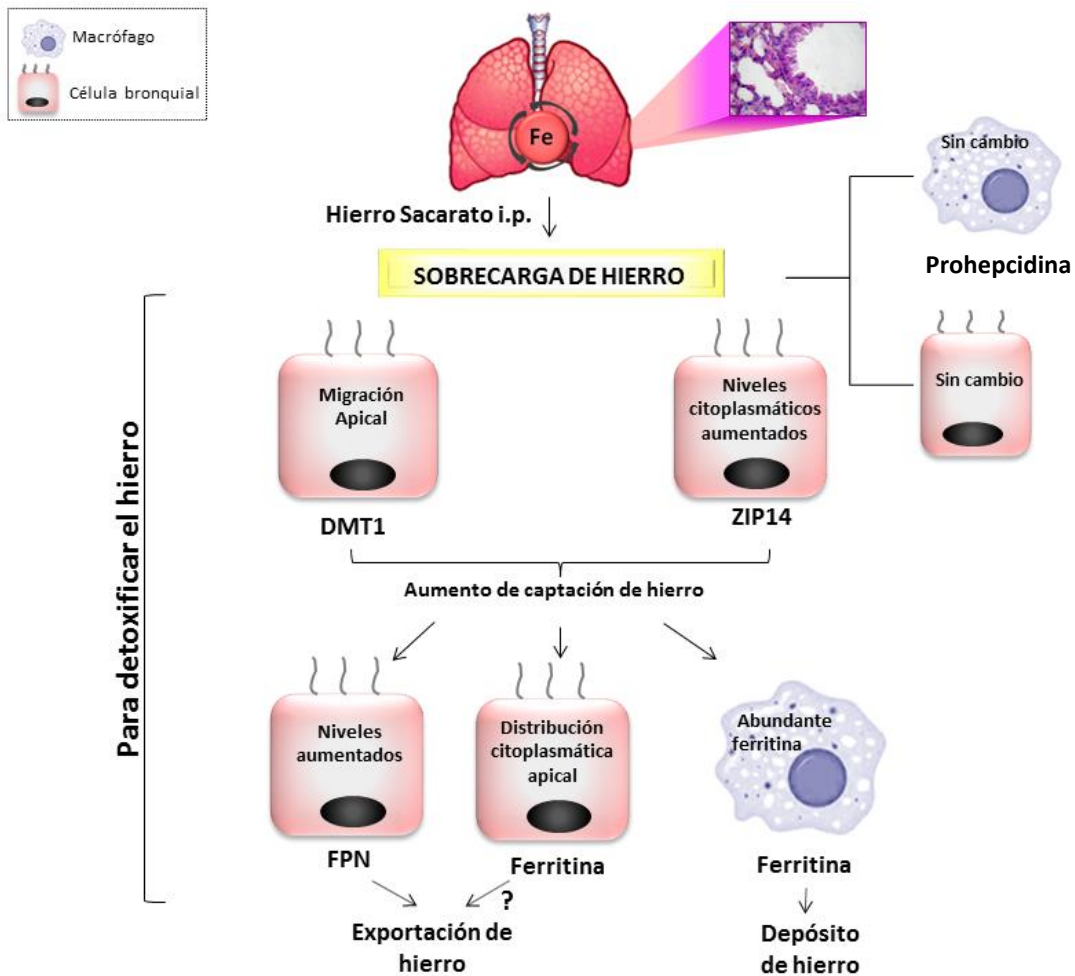


Figura 118. Vía propuesta para detoxificar el hierro en exceso en Sobrecarga de Hierro. La localización apical de DMT1 y el aumento de la proteína ZIP14 en las células bronquiales indican funciones específicas de ambas proteínas en la importación del exceso de hierro. La localización de FPN y de ferritina en el citoplasma apical de las células bronquiales evidencian las funciones de ambas proteínas en la exportación del hierro libre y del hierro en forma de ferritina. El aumento de ferritina en macrófagos evidencia la función de estas células en el almacenamiento del exceso de hierro pulmonar. Prohepcidina pulmonar no participaría en la regulación de las vías de movilización del exceso de hierro en células bronquiales y en macrófagos alveolares.

MODELO DE DEFICIENCIA DE HIERRO

El estudio de las proteínas del hierro en pulmón en el Modelo Animal de Deficiencia de Hierro fue útil para profundizar nuestro conocimiento sobre el ciclo del hierro pulmonar en estados de desbalance.

Es importante notar que la flebotomía crónica indujo una disminución de los niveles de hierro en hígado y en bazo mostrados en el capítulo 2. Por el contrario, los niveles de hierro en pulmón no se modificaron frente a la flebotomía crónica. Además, no se observaron cambios en la expresión de ferritina pulmonar en deficiencia. Sin duda estos resultados claramente indican que, a diferencia del hígado y del bazo, el pulmón está bien protegido contra la deficiencia de hierro posiblemente por la regulación de las vías de importación y exportación del hierro.

ZIP14 pulmonar

Diversos autores han estudiado la regulación del transportador ZIP14 en tejidos clásicamente relacionados con el ciclo del hierro, como duodeno e hígado, en modelos animales que representan condiciones clínicopatológicas asociadas con bajos niveles de hierro (Hansen et al., 2009; Nam & Knutson, 2012; Nam et al., 2013). Sin embargo, su función pulmonar en estados de alta demanda eritropoyética no ha sido aclarada.

Un aporte novedoso de nuestros estudios fue demostrar la disminución de ZIP14 en las células bronquiales en deficiencia de hierro, que indicaría que este transportador no posee una función destacada en la importación de hierro cuando la demanda es elevada. Nam et al. (2013) describieron que ZIP14 no participa en la captación de hierro en otros órganos como hígado, páncreas y corazón en ratas alimentadas con una dieta baja en hierro.

Si bien la regulación de ZIP14 no ha sido totalmente esclarecida, un estudio reciente mostró que este transportador es regulado por la proteína de la hemocromatosis (HFE) (Gao et al., 2008). HFE es similar a las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, y tiene una función crítica en la regulación de la síntesis hepcidina en hepatocitos (Rishi et al., 2015). Con respecto a la asociación regulatoria entre HFE y ZIP14, Gao et al. (2008) describieron que la sobreexpresión de HFE disminuye los niveles de ZIP14 reduciendo la captación del hierro libre en una línea celular humana de hepatoma. En este sentido, el aumento de HFE que detectamos en las células bronquiales en deficiencia de hierro podría explicar la disminución de los niveles de ZIP14.

Transportador de metales divalentes 1 pulmonar

Según lo que describimos en el tejido objeto de nuestros estudios, la localización de DMT1 en la membrana apical en las células bronquiales y el aumento de su nivel proteico en pulmón indicarían que DMT1 funcionaría como una proteína importadora de hierro. Este mecanismo suministraría al pulmón el hierro requerido en un estado de deficiencia.

El aumento de DMT1 podría ser mediado por una regulación post-transcripcional dependiente de la interacción IRP-IRE, debido a que se ha descrito que cuando el nivel de hierro es bajo las proteínas IRPs se activan y se unen al segmento IRE localizado en el extremo 3' del ARNm de DMT1 (Andrews, 1999). Esta interacción estabiliza el transcripto de DMT1 aumentando su traducción (Andrews, 1999). Un estudio de Brain et al. (2006) avalaría esta hipótesis sobre la regulación post-transcripcional de DMT1, porque no detectó cambios en el ARNm de DMT1 en el pulmón en ratas flebotomizadas. En este sentido, la existencia de una regulación post-transcripcional explica la ausencia de cambios en los niveles del ARNm de DMT1 evidenciada por Brain et al. (2006) y el aumento de la proteína que detectamos en nuestro estudio.

Receptor de transferrina 1 pulmonar

Como fue mencionado anteriormente, la vía de captación del hierro unido a transferrina en el pulmón es mediada por la expresión del RTf1 en las células bronquiales (Heilig et al., 2006). La mayor absorción pulmonar del hierro unido a transferrina en un estado de alta demanda fue evidenciada por el aumento de los niveles proteicos de RTf1 que observamos en deficiencia de hierro. En coincidencia con estos resultados, Heilig et al. (2006) han descrito previamente que la expresión pulmonar del RTf1 aumentó en ratas alimentadas con una dieta pobre en hierro.

El aumento del RTf1 pulmonar en deficiencia de hierro podría ser explicado por la regulación post-transcripcional del receptor mediada por las proteínas reguladoras del hierro (IRPs). La unión de las proteínas IRPs activas al segmento IRE del ARNm del RTf1, cuando el hierro celular es bajo, protege al transcripto de la degradación por ARNasas aumentando la expresión del receptor (Muckenthaler et al., 2008).

Ferroportina pulmonar

El estudio del exportador FPN en el Modelo de Deficiencia de Hierro fue relevante, debido a que nos permitió explicar cómo las células bronquiales controlan el nivel celular de hierro en un estado que presenta elevada captación celular de hierro mediada por DMT1 y RTf1. La localización de FPN en el citoplasma apical en las células bronquiales le adjudicaría a esta proteína una función específica en la exportación de hierro en deficiencia, para mantener niveles celulares adecuados de hierro. La localización apical del exportador en las células bronquiales es consistente con la expresión de FPN descrita previamente en condiciones basales (Yang et al. 2005).

Posiblemente, la hipoxia inducida por el sangrado sería responsable de la regulación específica de FPN en este tejido, debido a que el promotor del gen de FPN contiene un elemento de respuesta al factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) (Ward & Kaplan, 2012).

Proteína de la hemocromatosis pulmonar

Diversos estudios han evaluado la alteración del metabolismo del hierro que se produce por mutaciones del gen HFE, que genera hemocromatosis hereditaria (Bardou-Jacquet et al., 2014). La hemocromatosis hereditaria es una enfermedad genética que cursa con sobrecarga sistémica de hierro por la deficiente producción de hepcidina, por lo que la relación entre HFE y la sobrecarga de hierro ha sido ampliamente estudiada (Beutler, 2006). Sin embargo, su función en la deficiencia de hierro no ha sido totalmente aclarada.

Un aporte novedoso que le adjudicaría a HFE una función en deficiencia de hierro es su aumento y su redistribución hacia la membrana apical de las células bronquiales en deficiencia de hierro. Si bien no se conocen claramente los mecanismos moleculares que regulan la expresión de HFE cuando la demanda de hierro es alta, se sugiere que sería regulada transcripcionalmente en deficiencia de hierro. En este contexto un estudio reciente demostró el aumento del ARNm de HFE en pulmón en ratas alimentadas con una dieta deficiente en hierro (Li et al., 2013).

La redistribución de HFE que detectamos en las células bronquiales en deficiencia de hierro genera un nuevo aporte sobre su actividad pulmonar en la alta demanda. La

localización de HFE y de FPN en el citoplasma apical en las células bronquiales, podría evidenciar la acción regulatoria de HFE sobre la liberación del hierro en deficiencia. En efecto, se ha sugerido que HFE disminuye la exportación de hierro a través de FPN en macrófagos (Drakesmith et al., 2002). Además, según Arredondo et al. (2006), HFE disminuye la captación de hierro mediante la interacción directa con DMT1 en la membrana apical de células duodenales. Por lo tanto, dada la localización similar de HFE y DMT1 en células bronquiales podríamos sugerir que HFE regula la captación de hierro en estas células pulmonares.

Un estudio reciente describió que HFE podría tener una función fisiológica en condiciones de deficiencia de hierro limitando la captación de hierro en células eritroides (Ramos P. et al., 2011). A partir de nuestros resultados sugerimos que en el pulmón HFE también podría cumplir una función regulatoria en deficiencia de hierro. El aumento de HFE y su localización apical reflejarían que esta proteína podría ejercer funciones regulatorias sobre la exportación de hierro mediada por FPN y la captación de hierro por DMT1 y ZIP14 en células bronquiales en deficiencia de hierro. La regulación funcional de los transportadores por HFE podría ser un mecanismo de control presente en las células bronquiales para evitar los efectos tóxicos del hierro producidos por una exacerbada absorción celular de este biometal.

Prohepcidina pulmonar

A diferencia del tejido pulmonar, los estudios sobre la regulación de hepcidina en hígado, muestran claramente una regulación negativa mediada por EPO y por factores relacionados con la hipoxia (Nicolas et al., 2002).

En este contexto recientemente se ha identificado que la EPO liberada en la anemia regula negativamente la transcripción de hepcidina hepática por vías regulatorias que involucrarían la síntesis del regulador eritroide ERFE en eritroblastos, que inhibe la síntesis de la hormona (Gammella et al., 2015). Por otro lado, la hipoxia favorece la forma heterodimérica del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) permitiendo su unión a elementos de respuesta a hipoxia (HRE, *hypoxia responsive element*) localizados en el gen que codifica para hepcidina, lo que bloquearía la transcripción de hepcidina en hígado (Semenza, 2000; Peyssonnaud et al., 2007). Además, estudios recientes demostraron que la

hipoxia también controla la regulación de hepcidina en hepatocitos mediante la estimulación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que regula negativamente a hepcidina a través del factor de transcripción CREB/H (Sonnweber et al., 2014).

Estos autores muestran claramente que en estados de alta demanda de hierro la síntesis de hepcidina hepática disminuye por diversas vías regulatorias. A diferencia de lo que ocurre en hígado, nuestros resultados en pulmón no muestran cambios en la expresión de prohepcidina en las células bronquiales y en los macrófagos alveolares. Nuestros estudios podrían indicar que prohepcidina no sería regulada en estados de alta demanda eritropoyética en el tejido pulmonar.

CONCLUSIONES

Nuestros estudios realizan un importante aporte sobre las relaciones regulatorias entre las proteínas que movilizan y regulan el hierro en el tejido pulmonar en un estado de alta demanda de hierro.

En deficiencia de hierro, DMT1 y RTf1 son las principales proteínas que captan hierro en las células bronquiales para satisfacer las necesidades nutricionales, siendo ZIP14 un importador con una función poco relevante. Ferroportina exportaría el hierro de las células bronquiales como parte de un mecanismo beneficioso que mantiene un adecuado nivel de hierro cuando su absorción celular es elevada. Estas vías de movilización del hierro pulmonar podrían ser reguladas por HFE, que actuaría en coordinación con DMT1, ZIP14 y FPN para regular los procesos celulares de importación y de exportación de hierro y, de esta manera, controlar los niveles de hierro en células bronquiales. Por el contrario, la producción de hepcidina pulmonar no participaría en la regulación del metabolismo del hierro en el pulmón cuando la eritropoyesis está activa.

Finalmente, podemos concluir que en las células bronquiales existe una vía regulatoria que controla los procesos de importación y de exportación de hierro para satisfacer su demanda pulmonar en un estado de elevado requerimiento tisular y sistémico de hierro (Figura 119).

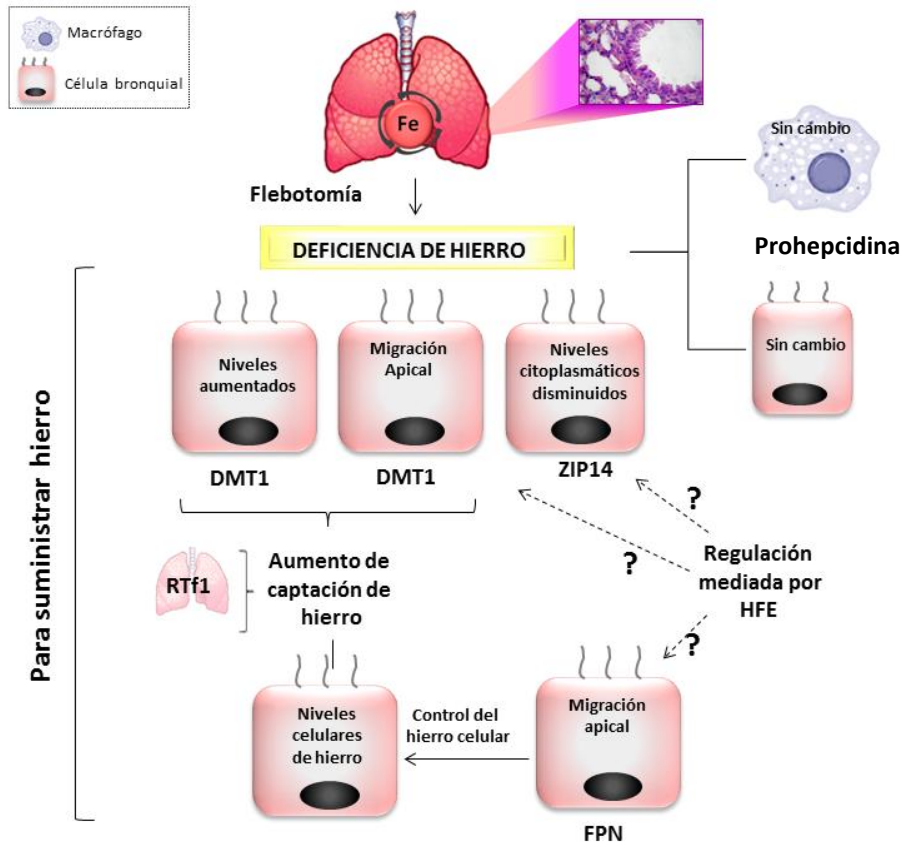


Figura 119. Vía propuesta para suministrar hierro al pulmón en Deficiencia de Hierro. La distribución apical de DMT1 y el aumento de las proteínas DMT1 y RTf1 indican funciones específicas de DMT1 y RTf1 en el suministro de hierro, siendo ZIP14 un transportador con una menor función. La localización apical de FPN conduce a la exportación del hierro para mantener niveles adecuados de hierro. El aumento de HFE y su localización en el citoplasma apical evidencia su acción coordinada con FPN, DMT1 y ZIP14 para controlar la importación y exportación de hierro en las células bronquiales. Prohepcidina pulmonar no regularía la movilización de hierro en células bronquiales y macrófagos en deficiencia de hierro.

Capítulo 6

Sistema Celular de Neuroblastoma Humano.
Caracterización de las proteínas del hierro y su
regulación en inflamación por estrés oxidativo

En la bibliografía se encuentra ampliamente descrito que la acumulación de hierro y ciertos procesos inflamatorios se asocian con enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad Parkinson y la Enfermedad Alzheimer (Sian-Hülsmann et al., 2011; Urrutia et al., 2014).

En la Enfermedad de Parkinson (EP), el hierro que se acumula en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (estructuras de los ganglios basales) contribuiría a la muerte neuronal por el daño oxidativo que produce el hierro libre (Núñez et al., 2012). Además de la alteración del hierro neuronal, en pacientes con EP también se ha identificado la presencia de altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias en el cerebro y en el fluido cerebroespinal, incluyendo IL-6 y TNF- α (Mogi et al., 1994; Mogi et al., 1996).

Recientemente, Urrutia et al. (2013) describieron la asociación regulatoria entre el hierro y la inflamación en neuronas, identificando que las citoquinas pro-inflamatorias inducen una movilización del hierro neuronal que produce acumulación celular del biometal. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan la movilización del hierro en neuronas en el estado de inflamación han sido parcialmente aclarados.

En humanos y en modelos animales con Enfermedad de Parkinson, que presentan altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias, se demostró que la proteína reguladora del hierro 1 (IRP1) se activa en la sustancia negra, postulándose el efecto de las especies reactivas del oxígeno (ROS) sobre su activación (Hirsch, 2006; Salazar et al., 2006). Sin embargo, no se conoce claramente si la activación de IRP1 por el estrés oxidativo inducido por la inflamación es el mecanismo regulatorio que controla el transporte de hierro originando la sobrecarga de hierro en las neuronas dopaminérgicas.

Sin duda, el abordaje de aspectos moleculares que relacionan la inflamación con el ciclo del hierro neuronal constituiría un aporte relevante para el conocimiento de enfermedades neurodegenerativas. Por ello, abordamos el estudio de los efectos de la inflamación mediada por citoquinas (IL-6 y TNF- α) y por LPS sobre la actividad de IRP1 y su relación regulatoria con DMT1, RTf1 y ferritina en células de neuroblastoma humano.

Regulación de la proteína reguladora de hierro 1

Las proteínas reguladoras del hierro (IRPs) son proteínas citosólicas que unen elementos de respuesta al hierro (IREs) ubicados en la región 5' o 3' no traducida del ARNm que codifica proteínas del hierro, como DMT1, Rtf1 y ferritina (Anderson et al., 2012).

Como se mencionó anteriormente, existen dos proteínas IRPs denominadas IRP1 e IRP2, siendo IRP1 una proteína bifuncional. Cuando el hierro celular es elevado, IRP1 existe como una aconitasa citosólica. Sin embargo, cuando el hierro celular es bajo IRP1 presenta una configuración abierta asociada con la pérdida de átomos de hierro en el *cluster* [4Fe-4S], por lo que puede unirse al segmento IRE del ARNm regulando la traducción de las proteínas. Existen también otros estímulos que inducen la activación de IRP1, como la activación de IRP1 por el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la fosforilación de esta proteína reguladora (Wallander et al., 2006).

Nuestros estudios identificaron que las citoquinas pro-inflamatorias y el LPS aumentan la actividad de IRP1 en las células SH-SY5Y, sin modificar los niveles proteicos. Una hipótesis atractiva que explicaría el aumento de la actividad de IRP1 y no de la proteína es la regulación de IRP1 por estímulos que afecten su actividad a través de la pérdida del *cluster* Fe-S. En este sentido, se ha descrito que el aumento de ROS inicia la pérdida de dicho *cluster* en la proteína IRP1, por lo que esta proteína reguladora presenta una configuración abierta y puede unirse al segmento IRE del ARNm (Wallander et al., 2006; Anderson et al., 2012).

Sin embargo, la activación de IRP1 por citoquinas y LPS que demostramos en las células pre-incubadas con el antioxidante, sugiere que la regulación de la actividad de IRP1 por la inflamación no sería mediada por ROS en las células SH-SY5Y. Por lo tanto, otro mecanismo que participaría en su activación podría involucrar el aumento de la actividad de IRP1 por un mecanismo de fosforilación. Eisenstein (1996) describió que IRP1 es activada a través de su fosforilación por la proteína quinasa C (PKC) en células HL-60, sugiriendo que la fosforilación de IRP1 afectaría el ensamblaje del *cluster* Fe-S. En este sentido, Wang W. et al. (2012) demostraron que IRP1 es regulada por PKC en neuronas dopaminérgicas.

El diseño de un modelo celular que expresa bajos niveles de IRP1 (*knockdown* para IRP1) fue relevante para nuestro estudio, dado que nos permitió evaluar la función de IRP1 en la regulación de las proteínas que movilizan hierro en la inflamación.

En los estudios realizados en nuestro modelo *knockdown* para IRP1 identificamos que los estímulos inflamatorios no modificaron la actividad de IRP1 en las células *knockdown*, a pesar del aumento de la proteína. Este aumento de la proteína y no de la actividad puede ser explicado porque por *Western blot* se detectan los niveles totales de IRP1 que corresponden a la forma aconitasa y a la forma que se une a IRE. En este sentido, se conoce que la forma de IRP1 que se une a IRE es sólo una parte de los niveles totales de la proteína (Wallander et al., 2006).

Regulación del transportador de metales divalentes 1

Existen evidencias que muestran que el importador de hierro DMT1 posee una función relevante en la captación del exceso de hierro relacionada con la neurodegeneración en ratones (Salazar et al., 2008). En células de neuroblastoma la función de DMT1 en la captación del hierro libre que causaría daño celular, fue evidenciada por el aumento de DMT1 en las células tratadas con citoquinas y con LPS.

Se conoce que la expresión de DMT1 es regulada tanto transcripcionalmente como post-transcripcionalmente (Andrews, 1999). Respecto de la regulación post-transcripcional, se ha descrito que la proteína IRP1 se une al segmento IRE del ARNm de DMT1 aumentando la estabilidad del transcripto, lo que favorece su traducción (Andrews, 1999). Por lo tanto, dado que demostramos la activación de IRP1 en inflamación, es razonable pensar que el aumento de DMT1 en las células SH-SY5Y tratadas con citoquinas y LPS podría ser regulado post-transcripcionalmente por el sistema IRE-IRP1.

Sin embargo, cuando las células se pre-trataron con NAC y luego se incubaron con estímulos inflamatorios, observamos una disminución de DMT1 y una activación de IRP1. Estos resultados muestran que DMT1 en inflamación no es regulada principalmente por IRP1. Si la expresión de DMT1 fuera regulada por IRP1 en las células tratadas con NAC y con estímulos inflamatorios (citoquinas y LPS), deberíamos haber observado un aumento de DMT1 dado que la interacción de IRP1 con IRE del ARNm de DMT1 estabiliza el transcripto y aumenta su expresión. Por lo contrario, vimos que DMT1 disminuye en las células tratadas con NAC y con estímulos inflamatorios (IL-6, TNF- α y LPS). Estos estudios sugieren la existencia de otro mecanismo regulatorio que controlaría la disminución de DMT1 en las células SH-SY5Y tratadas con NAC y con estímulos inflamatorios.

Se conoce que la expresión de DMT1 también es regulada transcripcionalmente por diversos estímulos como la hipoxia y las citoquinas pro-inflamatorias (Wessling-Resnick, 2010). Las citoquinas TNF- α y LPS inducen la activación del factor de transcripción NF- κ B que se transloca al núcleo regulando la expresión de diversos genes (Hanke & Kielian, 2011; Wajant & Scheurich, 2011). Entre los genes regulados por NF- κ B se ha identificado al de DMT1 en células de carcinoma embrionario (Paradkar & Roth, 2006).

Teniendo en cuenta estos estudios, podríamos sugerir que la activación del factor de transcripción NF- κ B por citoquinas y por LPS mediaría el aumento de DMT1 en las células SH-SY5Y que no se incubaron con antioxidante. Además, la disminución de DMT1 en las células tratadas con NAC y con inductores inflamatorios (citoquinas y LPS) podría ser explicada por una menor activación de NF- κ B en presencia de bajos niveles de ROS. En este sentido, se identificó que la disminución de ROS revierte el aumento de DMT1 inducido por un inductor de estrés oxidativo (1-metil-4-fenilpiridinio) mediante la inhibición de la translocación al núcleo de NF- κ B, disminuyendo la activación transcripcional de DMT1 (Xu et al., 2010).

Con el objetivo de profundizar nuestro estudio sobre la función reguladora de IRP1 en inflamación en células de neuroblastoma y estudiar la regulación de DMT1 en este estado, fue fundamental evaluar los cambios regulatorios de DMT1 en nuestro modelo celular *knockdown* para IRP1.

En ausencia de inflamación, el bajo nivel de DMT1 en las células *knockdown*, evidenciaría la función de IRP1 en la regulación del transportador en condiciones basales. En inflamación, la identificación de una clara tendencia en aumento del nivel proteico de DMT1 inducido por citoquinas y por LPS en las células *knockdown* para IRP1, sugiere que el aumento de DMT1 no sería mediado principalmente por el sistema IRE-IRP1 en esta condición inflamatoria.

Para avanzar en el estudio de la regulación de DMT1 en las células *knockdown*, se analizaron los niveles del ARNm del transportador. Estos resultados mostraron que las citoquinas y el LPS tendieron a aumentar el nivel del ARNm de DMT1 en las células *knockdown* (Clon 9), sugiriendo que el mecanismo regulador responsable del aumento de los niveles proteicos de DMT1 sería mediado principalmente por una regulación transcripcional. Como mencionamos anteriormente, el mecanismo regulador mediado por NF- κ B podría ser el mecanismo responsable del aumento del nivel del ARNm y de la proteína

de DMT1 inducido por citoquinas y LPS en las células que presentan escasa actividad de IRP1.

Una importante contribución de nuestros estudios en células de neuroblastoma es que el sistema regulatorio IRE-IRP1 no sería el principal mecanismo que aumenta el nivel de DMT1 en inflamación en células SH-SY5Y. En este contexto, nuestra hipótesis sobre la existencia de otros mecanismos transcripcionales en la inflamación que regularían el aumento de DMT1, sería avalada por estudios recientes que identificaron un aumento del ARNm de DMT1 y de su proteína en neuronas del hipocampo tratadas con IL-6, LPS y TNF- α (Urrutia et al., 2013).

Regulación del receptor de transferrina 1

La captación del hierro unido a transferrina (TBI) mediada por el RTf1 es un mecanismo de incorporación de hierro que ha sido identificado en neuronas (Moos, 1996). Nuestros estudios no mostraron cambios en el nivel proteico del RTf1, sugiriendo que este receptor no participaría en la movilización del hierro inducida por citoquinas y LPS en células SH-SY5Y. También, identificamos que ROS no controlaría los niveles de RTf1 en células SH-SY5Y, debido a que el tratamiento con antioxidantes no modificó los niveles del receptor.

Sin embargo, un estudio reciente identificó el aumento del RTf1 en neuronas del mesencéfalo tratadas con IL-1 β y TNF- α (Wang et al., 2013). Las discrepancias en los resultados pueden deberse al mayor tiempo de incubación con citoquinas que empleó Wang et al. (2013) (24 hs.) respecto del nuestro (18 hs.). Otros autores también mostraron cambios en la expresión del RTf1 inducidos por citoquinas pro-inflamatorias en astrocitos y en células hepáticas en tratamientos de 24 hs. de duración (Hirayama et al., 1993; Pelizzoni et al., 2013).

Regulación de ferritina

La capacidad para secuestrar hierro que posee la ferritina le confiere la habilidad de detoxificar el exceso de hierro en diversos tipos celulares, como hepatocitos y macrófagos (Ponka, 1999). En células SH-SY5Y el aumento de ferritina inducido por los estímulos inflamatorios, principalmente por TNF- α , sugeriría un mayor depósito de hierro. El aumento de las reservas de hierro neuronal podría ser explicado por la mayor captación de hierro a través de los niveles aumentados de DMT1.

La activación transcripcional de ferritina es regulada por la unión del factor nuclear Nrf2 a un segmento denominado “elemento de respuesta antioxidante” (ARE) (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014). El factor de transcripción Nrf2 controla el estado redox celular y es regulado a través de una compleja red de proteínas que induce su aumento durante diversos estados de estrés oxidativo, como la inflamación (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014). Cuando los niveles de ROS aumentan, el factor Nrf2 se estabiliza y se transloca al núcleo, uniéndose a la secuencia ARE en el promotor del gen de ferritina estimulando su transcripción (Ray et al., 2012).

En este sentido, el aumento de ferritina en las células SH-SY5Y que identificamos en inflamación podría ser regulado por la translocación de Nrf2 al núcleo inducida por el aumento de ROS en células SH-SY5Y tratadas con citoquinas y LPS. Esta vía regulatoria también explicaría la disminución de ferritina que observamos en células pre-tratadas con el antioxidante, debido a que la menor producción de ROS disminuiría la activación de la vía ROS-Nrf-ARE. La disminución de ferritina en las células tratadas únicamente con NAC (sin citoquinas y sin LPS) evidencia que los niveles basales de ferritina también serían regulados por ROS.

Además de la mencionada regulación transcripcional, la ferritina es regulada post-transcripcionalmente por el sistema IRE-IRP (Torti & Torti, 2002). A diferencia de DMT1, el ARNm de ferritina posee el segmento IRE en su extremo 5', por lo que al aumentar la actividad de unión de IRP1 al IRE del ARNm se bloquea la traducción de esta proteína de depósito (Torti & Torti, 2002). En este sentido, la baja actividad de IRP1 en las células *knockdown* explica el aumento de los niveles de ferritina que encontramos tanto en estas células tratadas con estímulos inflamatorios como en las no tratadas. Este aumento de ferritina en las células *knockdown* para IRP1 podría ser una respuesta regulatoria beneficiosa para estas células ya que podrían depositar en la ferritina mayores niveles de hierro disminuyendo su toxicidad, sin la necesidad de aumentar los niveles proteicos de ferritina durante la inflamación.

CONCLUSIONES

Podemos concluir que las citoquinas y el LPS inducen una regulación de la movilización del hierro en las células SH-SY5Y, demostrando que la inflamación produce cambios en el metabolismo del hierro neuronal.

Nuestros estudios muestran que la inflamación inducida por IL-6, TNF- α y LPS, producen la activación de IRP1 por un mecanismo independiente de ROS. También postulamos que en las células SH-SY5Y el aumento de DMT1 inducido por citoquinas y LPS no sería regulado principalmente por IRP1. Proponemos que el aumento de DMT1 sería regulado mayoritariamente por un control transcripcional, que podría ser mediado por el factor de transcripción NF- κ B.

Nuestros estudios también evidencian que en inflamación DMT1 sería la principal proteína que captaría el hierro en las células de neuroblastoma respecto de la función del RTf1, que ocasionaría un aumento del hierro neuronal que podría inducir daño celular. Un mecanismo presente en células de neuroblastoma que limitaría el hierro libre en condiciones inflamatorias, es el aumento de ferritina. Las células *knockdown* para IRP1 podrían estar más protegidas contra el hierro que las células normales, dado que expresan mayores niveles de ferritina por la baja actividad de IRP1.

El empleo de antioxidantes disminuiría la captación de hierro en células de neuroblastoma a través de la disminución DMT1.

Finalmente, podemos concluir que en inflamación el aumento de DMT1 en las células SH-SY5Y, posiblemente mediado por una regulación transcripcional, aumentaría la captación de hierro. El aumento de ferritina sería una respuesta fisiológica que intentaría limitar la toxicidad del hierro libre. Además, la disminución de la producción de ROS podría reducir la captación de hierro promovida por la inflamación, mediante la menor expresión de DMT1 (Figura 118).

Discusión

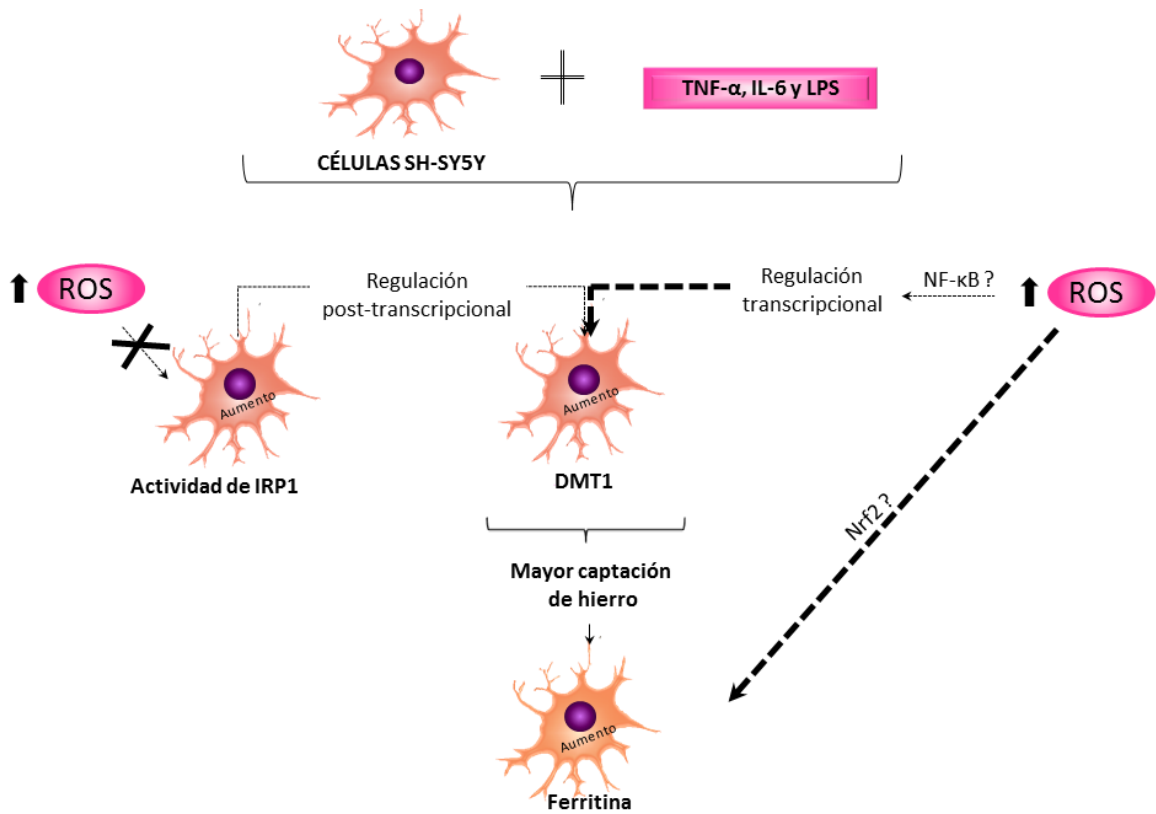


Figura 118. Vía propuesta para la regulación de las proteínas del hierro en células de neuroblastoma en inflamación. El aumento de DMT1 conduce a una mayor captación de hierro celular aumentando el depósito de hierro neuronal como ferritina. El aumento de DMT1 es controlado principalmente por una regulación transcripcional mediada por ROS. La activación de IRP1 independiente de ROS no es un mecanismo regulatorio esencial para el aumento de DMT1 en la inflamación. El aumento de ferritina es controlado por un mecanismo dependiente de los niveles celulares de ROS.

CONCLUSIONES FINALES

Modelo Animal de Sobrecarga de Hierro

- La acción coordinada de DMT1 y prohepcidina del páncreas endocrino constituye una ventaja biológica al limitar la captación de hierro y reducir sus efectos tóxicos.
- El daño renal sobre las células proximales depende principalmente de la acción del importador ZIP14.
- Se postula que la detoxificación del hierro pulmonar no dependería de hepcidina sino de la acción coordinada de DMT1-RTF1-FPN-Ferritina.

Modelo Animal de Deficiencia de Hierro

- DMT1 duodenal y renal participan en la captación de hierro para cubrir la demanda eritropoyética en coordinación con el hígado que limita la captación y aumenta su biodisponibilidad.
- Hepcidina pulmonar. Aumenta la biodisponibilidad de hierro mediada por DMT1-RTf1-FPN-HFE.

Modelo celular de Inflamación

- En las células SH-SY5Y los estímulos inflamatorios inducidos por citoquinas y lipopolisacárido originan mayor captación de hierro celular y como consecuencia aumento de ferritina, por un mecanismo mediado por DMT1.
- Postulamos que en inflamación la regulación transcripcional de DMT1 dependería de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y sería revertido por antioxidantes (NAC), mientras que la activación de IRP1 independiente de ROS no regularía la captación de hierro mediada por DMT1.

REFERENCIAS

1. Abouhamed M., Gburek J., Liu W., et al. (2006). 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(6): F1525–F1533.
2. Aisen P. (2004). Transferrin receptor 1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(11), 2137–2143.
3. Anderson C. P., Shen M., Eisenstein R. S., et al. (2012). Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1468–1483.
4. Anderson G. J., & Vulpe C. D. (2009). Mammalian iron transport. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66 (20), 3241–3261.
5. Andrews N. C. (2008). Forging a field : the golden age of iron biology. *Blood*, 112(2), 219–230.
6. Andrews, N. C. (1999). The iron transporter DMT1. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31(10), 991–994.
7. Andriopoulos B. J., Corradini E., Xia Y., et al. (2009). BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet.* 41(4), 482–487.
8. Arredondo M., Tapia V., Rojas A., Aguirre P., Reyes F., Marzolo M. P., & Núñez M. T. (2006). Apical distribution of HFE- β 2-microglobulin is associated with inhibition of apical iron uptake in intestinal epithelia cells. *BioMetals*, 19(4), 379–388.
9. Ashby D. R., Gale D. P., Busbridge M., et al. (2010). Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica*, 95(3), 505–508.
10. Awai M., Narasaki M., Yamanoi Y., et al. (1979). 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.
11. Babitt J. L., Huang F. W., Xia Y., et al. (2007). Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *Journal of Clinical Investigation*, 117(7), 1933–1939.
12. Bailie G. R., Schuler C., Leggett R. E., et al. (2013). Oxidative effect of several intravenous iron complexes in the rat. *Biometals*, 26(3), 473–478.

Referencias

13. Bardou-Jacquet E., Ben Ali Z., Beaumont-Epinette M. P., et al. (2014). Non-HFE hemochromatosis: Pathophysiological and diagnostic aspects. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 38(2), 143–154.
14. Basilion J. P., Rouault T. A, Massinople C. M., et al. (1994). The iron-responsive element-binding protein: localization of the RNA-binding site to the aconitase active-site cleft. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(2), 574–578.
15. Beilby J. P., Prins A. W., & Swanson N. R. (1999). Determination of hepatic iron concentration in fresh and paraffin-embedded Tissue. *Clinical Chemistry*, 45(4), 573–574.
16. Beutler E. (2006). Hemochromatosis: genetics and pathophysiology. *Annual Review of Medicine*, 57, 331–347.
17. Bhandari S., & Galanello R. (2012). Renal aspects of thalassaemia a changing paradigm. *European Journal of Haematology*, 89(3), 187–197.
18. Bligh, J. (1973). Temperature regulation in mammals and other vertebrates. *Frontiers of Biology* 30. American Elsevier, New York.
19. Boenisch, T. (2002). Manual Métodos inmunohistoquímicos de coloración, 3era edicion. DAKO corporation.
20. Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
21. Brain J. D., Heilig E., Donaghey T. C., et al. (2006). Effects of iron status on transpulmonary transport and tissue distribution of Mn and Fe. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 34(3), 330–337.
22. Brasselagnel C., Karim Z., Letteron P, et al. (2011). Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. *Gastroenterology*, 140(4), 1261–1271.
23. Brigham E. P., McCormack M. C., Takemoto C. M., et al. (2015). Iron Status is Associated with Asthma and Lung Function in US Women. *PloS One*, 10(2), 1–12.
24. Brissot P., Ropert M., Le Lan C., et al. (2012). Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(3), 403–410.
25. Cairo G., Castrusini E., Minorri G., et al. (1996). Superoxide inhibition protective and hydrogen of iron stratagem protein oxidative regulatory against activity : injury a. *FASEB*, 10 (11), 1326–1335.
26. Canonne-Hergaux F., & Gros P. (2002). Expression of the iron transporter DMT1 in kidney from normal and anemic mk mice. *Kidney International*, 62(1), 147–156.

Referencias

27. Canonne-Hergaux F., Gruenheid S., Ponka P., et al. (1999). Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood*, 93(12), 4406–4417.
28. Casanovas G., Spasic M. V., Casu C., et al. (2013). The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. *Haematologica*, 98(3), 444–447.
29. Casey J. L., Hentze M. W., Koeller D. M., et al. (1988). Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science*, 240(4854), 924–928.
30. Chiabrando D., Fiorito V., Marro S., et al. (2013). Cell-specific regulation of Ferroportin transcription following experimentally-induced acute anemia in mice. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 50(1), 25–30.
31. Chodosh L. A., Carthew R. W., & Sharp P. A. (1986). A single polypeptide possesses the binding and transcription activities of the adenovirus major late transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, 6(12), 4723–4733.
32. Chung B., Chaston T., Marks J., et al. (2009). Hepcidin decreases iron transporter expression in vivo in mouse duodenum and spleen and in vitro in THP-1 macrophages and intestinal Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition*, 139(8), 1457–1462.
33. Committee on Care and Use of Laboratory Animals (1976). *Guide on Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC: NIH Publications [(Natl. Inst Health, Bethesda) No. 86-23 (DRR/NIH)].
34. Conrad M. E., Umbreit J. N., Peterson R. D., et al. (1993). Function of integrin in duodenal mucosal uptake of iron. *Blood*, 81(2), 517–521.
35. Coria-Avila G. A., Gavrila A. M., Ménard S., et al. (2007). Cecum location in rats and the implications for intraperitoneal injections. *Lab Animal*, 36(7), 25–30.
36. Corradini E., Rozier M., Meynard D., et al. (2011). Iron regulation of hepcidin despite attenuated Smad 1, 5, 8 signaling in mice without transferrin receptor 2 or Hfe. *Gastroenterology*, 141(5), 1907–1914.
37. D’Anna M. C., & Roque M. E. (2013). Physiological focus on the erythropoietin-hepcidin-ferroportin axis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91(5), 338–345.
38. D’Anna M. C., Veuthey T. V., & Roque M. E. (2009). Immunolocalization of Ferroportin in Healthy and Anemic Mice. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(1), 9–16.
39. De Domenico I., Ward D. M., & Kaplan J. (2007). Hepcidin regulation: Ironing out the details. *Journal of Clinical Investigation*, 117(7), 1755–1758.
40. De La Fuente González A., Rodríguez Lozano J., & Fonseca Capdevila E. (2007). Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western blot). *Piel*, 22(5), 252–258.

Referencias

41. Devore, J.L. (2001). Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 5ta edición. México: Editorial Thompson Learning.
42. Drakesmith H., Sweetland E., Schimanski L., et al. (2002). The hemochromatosis protein HFE inhibits iron export from macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15602–15607.
43. Drapier J. C., Hirling H., Wietzerbin J., et al. (1993). Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *The EMBO Journal*, 12(9), 3643–3649.
44. Eisenstein R. S. (1996). Phosphorylation and Activation of both Iron Regulatory Proteins 1 and 2 in HL-60 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 7168–7176.
45. Elbarghati L., Murdoch C., & Lewis C. E. (2008). Effects of hypoxia on transcription factor expression in human monocytes and macrophages. *Immunobiology*, 213(9-10), 899–908.
46. Emerilt J., Beaumont C., & Trevin F. (2001). Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother*, 55 (6), 333–339.
47. Fandrey J. (2004). Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(6), R977–R988.
48. Ferguson C. J., Wareing M., Ward D. T., et al. (2001). Cellular localization of divalent metal transporter DMT-1 in rat kidney. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 280(5), F803–F814.
49. Festing M. F. W., & Altman D. G. (2002). Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 43(4), 244–258.
50. Festing, M.F.W. (2006). Design and statistical methods in studies using animal models of development. *ILAR Journal*, 47, 5–14.
51. Fillebeen, C., Wilkinson, N., & Pantopoulos, K. (2014). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for the study of RNA-protein interactions: the IRE/IRP example. *J Vis Exp*, (94) doi: 10.3791/52230.
52. Fish, R.E., Brown, M. J., Danneman P. J., et al. (2008). *American College of Laboratory Animal Medicine. Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. 2nd edition. Academic Press.
53. Flanagan J. M., Truksa J., Peng H., et al. (2007). In vivo imaging of hepcidin promoter stimulation by iron and inflammation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 38(3), 253–257.
54. Fleming MD, Romano MA, Su MA, et al. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1148-53.

Referencias

55. Frank K. M., Schneewind O., & Shieh W.-J. (2011). Investigation of a researcher's death due to septicemic plague. *The New England Journal of Medicine*, 364(26), 2563–2564.
56. Frazer D. M., & Anderson G. J. (2005). Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(4), G631–G635.
57. Frazier M. D., Mamo, L. B., Ghio A. J., et al. (2011). Heparin expression in human airway epithelial cells is regulated by interferon- γ . *Respiratory Research*, 12(1), 100.
58. Fujishiro, H., Yano, Y., Takada, Y., Tanihara, M., & Himeno S. (2012). Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells. *Metallomics*, 4(7), 700-708.
59. Gagliardo B, Kubat N, Faye A, et al. (2009). Pro-hepcidin is unable to degrade the iron exporter ferroportin unless matured by a furin-dependent process. *J Hepatol*, 50: 394-401.
60. Gammella E., Diaz V., Recalcati S., et al. (2015). Erythropoietin's inhibiting impact on hepcidin expression occurs indirectly. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308(4), R330–R335.
61. Ganz T. (2003). Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, 102(3), 783–788.
62. Ganz T. (2011). Heparin and iron regulation , 10 years later Review article Heparin and iron regulation , 10 years later, 117(17), 4425–4433.
63. Ganz T., & Nemeth E. (2006). Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(7), 690–699.
64. Ganz T., Olbina G., Girelli D., et al. (2008). Immunoassay for human serum hepcidin Immunoassay for human serum hepcidina. *Blood*, 112(10), 4292–4297.
65. Ganz, T., & Nemeth, E. (2012). Heparin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, 1823(9), 1434–1443.
66. Ganz, T., & Nemeth, E. (2015). Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 500–510.
67. Gao J., Zhao N., Knutson M. D., et al. (2008). The hereditary hemochromatosis protein, HFE, inhibits iron uptake via down-regulation of Zip14 in HepG2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21462–21468.
68. García del Moral, R. (1993). *Laboratorio de anatomía patológica*. Madrid: Editorial Interamericana McGraw-Hill. ISBN: 84-481-0229-0.
69. Garrick M. D., Dolan K. G., Horbinski C., et al. (2003). DMT1: A mammalian transporter for multiple metals. *BioMetals*, 16(1), 41–54.

Referencias

70. Ghio A. J. (2009). Disruption of iron homeostasis and lung disease. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(7), 731–739.
71. Ghio A. J., Wang X., Silbajoris R., et al. (2003). DMT1 expression is increased in the lungs of hypotransferrinemic mice. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284(6), L938–L944.
72. Ghio A., Turi J., Yang F., et al. (2006). Iron homeostasis in the lung. *Biological Research*, 39(1), 67–77.
73. Giannetti A.M., & Bjorkman P.J. (2004) HFE and transferrin directly compete for transferrin receptor in solution and at the cell surface. *J Biol Chem* , 279(24): 25866-25875.
74. Girijashanker K., He L., Soleimani M., et al. (2009). Slc39a14 Gene Encodes ZIP14, A Metal/Bicarbonate Symporter: Similarities to the ZIP8 Transporter. *Mol. Pharmacol*, 73(5), 1413–1423.
75. Golde W. T., Gollobin P., & Rodriguez L. L. (2005). A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Animal*, 34(9), 39–43.
76. Graham R.-M., Chua A.-C.-G., Herbison C.-E., et al. (2007). Liver iron transport. *World Journal of Gastroenterology*, 13(35), 4725–4736.
77. Guida C., Altamura S., Klein F. A, et al. (2015). A novel inflammatory pathway mediating rapid hepcidin-independent hypoferremia. *Blood*, 125(14), 2265–2276.
78. Gunshin H., Mackenzie B., Berger U. V, et al. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388(6641), 482–488.
79. Gunshin H., Starr C. N., DiRenzo C., et al. (2005). Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood*, 106(8), 2879–2883.
80. Guo B., Phillips J. D., Yu Y., et al. (1995). Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21645–21651.
81. Gutschow P., Schmidt P. J., Han H., et al. (2015). A competitive enzyme-linked immunosorbent assay specific for murine hepcidin-1: correlation with hepatic mRNA expression in established and novel models of dysregulated iron homeostasis. *Haematologica*, 100(2), 167–177.
82. Gutteridge J. M., Rowley D. A, & Halliwell B. (1982). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of “catalytic” iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids. *The Biochemical Journal*, 206(3), 605–609.
83. Haile D. J., Rouault T. A, Harford J. B., et al. (1992). 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*, 89(24), 11735–11739.

Referencias

84. Han O., & Kim E.-Y. (2007). Colocalization of ferroportin-1 with hephaestin on the basolateral membrane of human intestinal absorptive cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(4), 1000–1010.
85. Hanke M. L., & Kielian T. (2011). Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 121(9), 367–387.
86. Hansen J. B., Tonnesen M. F., Madsen A. N., et al. (2012). Divalent Metal Transporter 1 Regulates Iron-Mediated ROS and Pancreatic β Cell Fate in Response to Cytokines. *Cell Metabolism*, 16(4), 449–461.
87. Hansen S. L., Ashwell M. S., Moeser A. J., et al. (2010). High dietary iron reduces transporters involved in iron and manganese metabolism and increases intestinal permeability in calves. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 656–665.
88. Hansen S. L., Trakooljul N., Liu H.-C., Moeser A. J., et al. (2009). Iron transporters are differentially regulated by dietary iron, and modifications are associated with changes in manganese metabolism in young pigs. *The Journal of Nutrition*, 139(8), 1474–1479.
89. Harrison P. M., & Arosio P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1275(3), 161–203.
90. Hastings, J.W., & Menaker, M. (1976). Physiological and biochemical aspects of circadian rhythms. *Federation Proc*; 35:2325-2357.
91. Hayes J. D., & Dinkova-Kostova A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 199–218.
92. He L., Wang B., Hay E. B., et al. (2009). Discovery of ZIP transporters that participate in cadmium damage to testis and kidney. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 250–257.
93. Healey E. G., Bishop B., Elegheert J., et al. (2015). Repulsive guidance molecule is a structural bridge between neogenin and bone morphogenetic protein. *Nat Struct Mol Biol*, 22(6), 458–465.
94. Heilig E. A, Thompson K. J., Molina R. M., et al. (2006). Manganese and iron transport across pulmonary epithelium. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 290(6), L1247–1259.
95. Hirayama M., Kohgo Y., Kondo H., et al. (1993). Regulation of iron metabolism in HepG2 cells: a possible role for cytokines in the hepatic deposition of iron. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 18(4), 874–880.
96. Hirsch E. C. (2006). Altered regulation of iron transport and storage in Parkinson ' s disease. *Journal of Neural Transmission*, (71), 201–204.

Referencias

97. Hoff J. (2000). Methods of Blood Collection in the Mouse. *Lab Animal*, 29(10), 47–53.
98. Iancu T. C. (1992). Ferritin and hemosiderin in pathological tissues. *Electron Microscopy Reviews*, 5(2), 209–229.
99. Iancu T. C. (2011). Ultrastructural aspects of iron storage, transport and metabolism. *Journal of Neural Transmission*, 118(3), 329–335.
100. Iancu T. C., Ward R. J., & Peters T. J. (1987). Ultrastructural observations in the carbonyl iron-fed rat, an animal model for hemochromatosis. *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 53(4), 208–217.
101. Ikeda Y., Enomoto H., Tajima S., et al. (2013). Dietary iron restriction inhibits progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 304(7), F1028–F1036.
102. Jelkmann W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 6), 1251–1258.
103. Jenkitkasemwong S., Wang C. Y., MacKenzie B., & Knutson M. D. (2012). Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP8. *BioMetals*, 25(4), 643–655.
104. Jenkitkasemwong S., Wang C.-Y., Coffey R., et al. (2015). SLC39A14 Is Required for the Development of Hepatocellular Iron Overload in Murine Models of Hereditary Hemochromatosis. *Cell Metabolism*, 22(1), 138–150.
105. Kaplan, J. (2002). Mechanisms of cellular iron acquisition: Another iron in the fire. *Cell*, 111(5), 603–606.
106. Kautz L., Meynard D., Monnier A., et al. (2008). Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*, 112(4), 1503–1509.
107. Kawabata H., Germain R. S., Vuong P. T., et al. (2000). Transferrin Receptor 2- α Supports Cell Growth Both in Iron-chelated Cultured Cells and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 16618–16625.
108. Kawabata H., Yang R., Hirama T., et al. (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(30), 20826–20832.
109. Keel S. B., Doty R. T., Yang Z., et al. (2008). A Heme Export Protein Is Required for Red Blood Cell Differentiation and Iron Homeostasis. *Science*, 319(5864), 825–828.
110. Kennedy M. C., Antholine W. E., & Beinert H. (1997). An EPR investigation of the products of the reaction of cytosolic and mitochondrial aconitases with nitric oxide. *J Biol Chem*, 272(33), 20340–20347.

Referencias

111. Khan A. A., & Quigley J. G. (2011). Control of intracellular heme levels: Heme transporters and heme oxygenases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(5), 668–682.
112. Knutson M. D., Oukka M., Koss L. M., et al. (2005). Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), 1324–1328.
113. Knutson M., & Wessling-Resnick M. (2003). Iron Metabolism in the Reticuloendothelial System. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38(1), 61–88.
114. Koch R. O., Zoller H., Theurl I., et al. (2003). Distribution of DMT 1 within the human glandular system. *Histology and Histopathology*, 18(4), 1095–1101.
115. Krause A., Neitz S., Mägert H-J, et al. (2000) LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters*, 480 (2-3):147–150.
116. Krijt J., Fujikura Y., Sefc L., et al. (2010). Hepcidin downregulation by repeated bleeding is not mediated by soluble hemojuvelin. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 59(1), 53–9.
117. Kristiansen M., Graversen J. H., Jacobsen C., et al. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 409(6817), 198–201.
118. Kudo H., Suzuki S., Watanabe A., et al. (2008). Effects of colloidal iron overload on renal and hepatic siderosis and the femur in male rats. *Toxicology*, 246(2-3), 143–147.
119. Kulaksiz H., Fein E., Redecker P., et al. (2008). Pancreatic B-cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. *Journal of Endocrinology*, 197(2), 241–249.
120. Kulaksiz H., Gehrke S. G., Janetzko A., et al. (2004). Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut*, 53(5), 735–743.
121. Kulaksiz H., Theilig F., Bachmann S., et al. (2005). The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *The Journal of Endocrinology*, 184(2), 361–70.
122. Kuzmac S., Grcevic D., Sucur A., et al. (2014). Acute hematopoietic stress in mice is followed by enhanced osteoclast maturation in the bone marrow microenvironment. *Experimental Hematology*, 42(11), 966–975.
123. Lane D., Bae D.-H., Merlot A., et al. (2015). Duodenal Cytochrome b (DCYTB) in Iron Metabolism: An Update on Function and Regulation. *Nutrients*, 7(4), 2274–2296.

Referencias

124. Lasocki S., Millot S., Andrieu V., et al. (2008). Phlebotomies or erythropoietin injections allow mobilization of iron stores in a mouse model mimicking intensive care anemia. *Critical Care Medicine*, 36(8), 2388–2394.
125. Latour C., Besson-fourmier C., Meynard D., et al. (2015). Differing impact of the deletion of hemochromatosis-associated molecules HFE and TFR2 on the iron phenotype of mice lacking BMP6 or HJV. *Hepatology*, 63(1):126-37.
126. Leal S. M., Roy S., Vareechon C., et al. (2013). Targeting Iron Acquisition Blocks Infection with the Fungal Pathogens *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum*. *PLoS Pathogens*, 9(7), e1003436.
127. Lee P. L., & Beutler E. (2009). Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annual Review of Pathology*, 4, 489–515.
128. Lee P. L., Gelbart T., West C., et al. (1998). The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 24(2), 199–215.
129. Lefebvre T, Dessendier N, Houamel D, et al. (2015). LC-MS/MS method for hepcidin-25 measurement in human and mouse serum: clinical and research implications in iron disorders. *Clin Chem Lab Med*, 53 (10):1557-1567.
130. Lenzen S., Drinkgern J., & Tiedge M. (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 463–466.
131. Li Y. Q., Bai B., Zheng Q. Q., et al. (2013). Quantitative Study of Iron Metabolism-related Genes Expression in Rat. *Biomedical and Environmental Sciences*, 26(10), 808–819.
132. Liuzzi J. P., Aydemir F., Nam H., et al. (2006). Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(37), 13612–13617.
133. Liuzzi J.P., Lichten L.A., Rivera S., et al. (2005). Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(19), 6843-6848.
134. Lok C. N., & Ponka P. (1999). Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 24147–24152.
135. Lopes T. J. S., Luganskaja T., Vujić Spasić M., et al. (2010). Systems analysis of iron metabolism: the network of iron pools and fluxes. *BMC Systems Biology*, 4, 112. <http://doi.org/10.1186/1752-0509-4-112>

Referencias

136. Lopez A., Cacoub P., Macdougall I. C., et al. (2015). Iron deficiency anaemia. *The Lancet*, 6736(15), 1–10.
137. Lou D.-Q., Nicolas G., Lesbordes J.-C., et al. (2004). Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood*, 103(7), 2816–2821.
138. Lu J. P., Hayashi K., & Awai M. (1989). Transferrin receptor expression in normal, iron-deficient and iron-overloaded rats. *Acta Pathologica Japonica*, 39(12), 759–764.
139. Lu J. P., Hayashi K., Okada S., et al. (1991). Transferrin receptors and selective iron deposition in pancreatic B cells of iron-overloaded rats. *Acta Pathologica Japonica*, 41(9), 647–652.
140. Lymboussaki A., Pignatti E., Montosi G., et al. (2003). The role of the iron responsive element in the control of ferroportin1/IREG1/MTP1 gene expression. *Journal of Hepatology*, 39(5), 710–715.
141. MacDonald MJ, Cook JD, & Epstein ML, F. C. (1994). Large amount of (apo)ferritin in the pancreatic insulin cell and its stimulation by glucose. *The FASEB Journal*, 8, 777–781.
142. Mackenzie B., Takanaga H., Hubert N., et al. (2007). Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochemical Journal*, 403(1), 59–69.
143. Martines, A. M. F., Masereeuw, R., Tjalsma, H., et al. (2013). Iron metabolism in the pathogenesis of iron-induced kidney injury. *Nature Reviews. Nephrology*, 9(7), 385–98.
144. McDonald C. J., Wallace D. F., Ostini L., et al. (2014). Parenteral vs. oral iron: influence on hepcidin signaling pathways through analysis of Hfe/Tfr2-null mice. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(2), G132– G139.
145. McKie A T., Marciani P., Rolfs A., et al. (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell*, 5(2), 299–309.
146. McKie A. T. (2001). An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron. *Science*, 291(5509), 1755–1759.
147. McKie A. T. (2008). The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochemical Society Transactions*, 36(6), 1239–1241.
148. Mena N. P., Esparza A., Tapia V., et al. (2008). Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294(1), G192–G198.
149. Metzen E., & Ratcliffe P. J. (2004). HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biological Chemistry*, 385(3-4), 223–230.
150. Meynard D., Kautz L., Darnaud V., et al. (2009). Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nature Genetics*, 41(4), 478–481.

Referencias

- 151.** Meyron-Holtz E. G., Ghosh M. C., Iwai K., et al. (2004). Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *The EMBO Journal*, 23(2), 386–395.
- 152.** Michels K., Nemeth E., Ganz T., et al. (2015). Hepcidin and Host Defense against Infectious Diseases. *PLOS Pathogens*, 11(8), e1004998.
- 153.** Mogi M., Harada M., Narabayashi H., et al. (1996) Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 211, 13–16.
- 154.** Mogi M., Harada M., Riederer P., et al. (1994) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* 165, 208–210.
- 155.** Moos T. (1996). Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 375(4), 675–692.
- 156.** Moos T., Trinder D., & Morgan E.H. (2000). Cellular distribution of ferric iron, ferritin, transferrin and divalent metal transporter 1 (DMT1) in substantia nigra and basal ganglia of normal and beta2-microglobulin deficient mouse brain. *Cell Mol Bio*, ;46 (3):549-561.
- 157.** Moulouel B., Houamel D., Delaby C., et al. (2013). Hepcidin regulates intrarenal iron handling at the distal nephron. *Kidney International*, 84(4), 756–66.
- 158.** Mouse Genome Sequencing Consortium. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, 420(6915), 520-562.
- 159.** Muckenthaler M. U., Galy B., & Hentze M. W. (2008). Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annual Review of Nutrition*, 28, 197–213.
- 160.** Mueller S. (2005). Iron regulatory protein 1 as a sensor of reactive oxygen species. *BioFactors*, 24(1-4), 171–181.
- 161.** Muñoz M., Villar I., & García-Erce J. A. (2009). An update on iron physiology. *World Journal of Gastroenterology*, 15(37), 4617–4626.
- 162.** Nam H., & Knutson M. D. (2012). Effect of dietary iron deficiency and overload on the expression of ZIP metal-ion transporters in rat liver. *BioMetals*, 25(1), 115–124.
- 163.** Nam H., Wang C. Y., Zhang L., et al. (2013). 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*, 98(7), 1049–1057.

Referencias

164. Nemeth E. (2004). Heparin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science*, 306(5704), 2090–2093.
165. Nemeth E., Valore E. V., Territo M., et al. (2003). Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, 101(7), 2461–2463.
166. Nguyen N.-B., Callaghan K. D., Ghio A. J et al. (2006). Heparin expression and iron transport in alveolar macrophages. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291(3), L417–L425.
167. Nicolas G., Bennoun M., Devaux I., et al. (2001). Lack of heparin 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*, 98(15), 8780–8785.
168. Nicolas G., Chauvet C., Viatte L., et al. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide heparin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 110(7), 1037–1044.
169. Nohe A., Hassel S., Ehrlich, M., et al. (2002). The Mode of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Receptor Oligomerization Determines Different BMP-2 Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 5330–5338.
170. NRC. (2008). *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*. Washington: National Academies Press.
171. Núñez M. T., Tapia V., Rojas A., et al. (2010). Iron supply determines apical/basolateral membrane distribution of intestinal iron transporters DMT1 and ferroportin 1. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 298(3), C477–C485.
172. Núñez M. T., Urrutia P., Mena N., et al. (2012). Iron toxicity in neurodegeneration. *BioMetals*, 25(4), 761–776.
173. Oates P. S., Trinder D., & Morgan E. H. (2000). Gastrointestinal function, divalent metal transporter-1 expression and intestinal iron absorption. *Pflügers Archiv*, 440(3), 496.
174. Olivieri N. F., & Brittenham G. M. (2013). Management of the thalassemias. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(6) pii: a011767.
175. Opie T. (1899). A case of Haemochromatosis.-the relation of Haemochromatosis to bronzed diabetes. *Journal of Experimental Medicine*, 4(3-4), 279–306.
176. Ortiz Polo I., Paredes Arquiola J. M., López Serrano A., et al. (2012). Hemochromatosis: etiopatogenia, diagnóstico y estrategia terapéutica. *Medicine (Spain)*, 11(19), 1153–1161.
177. Oyarzabal M. I. (2011). Líneas de ratones originales como modelos experimentales en genética y mejoramiento animal. *BAG - Journal of Basic and Applied Genetics*, 22(1), 1–5.

Referencias

178. Pagani A., Silvestri L., Nai A., et al. (2008). Hemojuvelin N-terminal mutants reach the plasma membrane but do not activate the hepcidin response. *Haematologica*, 93(10), 1466–1472.
179. Pak M., Lopez M. A., Gabayan V., et al. (2006). Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*, 108(12), 3730–3735.
180. Pantopoulos K. (2008). Function of the hemochromatosis protein HFE: lessons from animal models. *World J Gastroenterol*, 14(45): 6893-6901.
181. Pantopoulos K., & Hentze M. W. (1995a). Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), 1267–71.
182. Pantopoulos K., & Hentze M. W. (1995b). Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein. *The EMBO Journal*, 14(12), 2917–2924.
183. Paradkar P. N., & Roth J. A. (2006). Post-translational and transcriptional regulation of DMT1 during P19 embryonic carcinoma cell differentiation by retinoic acid. *The Biochemical Journal*, 394(Pt 1), 173–183.
184. Park C. H., Valore E. V., Waring A. J., et al. (2001). Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7806–7810.
185. Parkkila S., Waheed A., Britton R. S., et al. (1997). Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), 2534–9.
186. Pelizzoni I., Zacchetti D., Campanella A., et al. (2013). Iron uptake in quiescent and inflammation-activated astrocytes: A potentially neuroprotective control of iron burden. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(8), 1326–1333.
187. Pérez G., Vittori D., Pregi N., et al. (2005). Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación, 39(3), 301–314.
188. Perls M. (1867). Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmentationen. *Virchows Archiv fur pathologische Anatomie und klinische Medizin*, 39:42.
189. Peyssonnaud, C., Zinkernagel, A. S., Schuepbach, R. A, et al. (2007). Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *Journal of Clinical Investigation*, 117(7), 1926–1932.
190. Pigeon C., Ilyin G., Courselaud B., et al. (2001). A New Mouse Liver-specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Hepcidin, Is Overexpressed during Iron Overload. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7811–7819.

Referencias

- 191.** Ponka P. (1999). Cellular iron metabolism. *Kidney International. Supplement*, 55(S69), S2–S11.
- 192.** Potrykus J., Stead D., MacCallum D. M., et al. (2013). Fungal Iron Availability during Deep Seated Candidiasis Is Defined by a Complex Interplay Involving Systemic and Local Events. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003676.
- 193.** Puissant C., & Houdebine L. M. (1990). An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *BioTechniques*, 8(2), 148–149.
- 194.** Raffin S. B., Woo C. H., Roost K. T., et al. (1974). Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. *The Journal of Clinical Investigation*, 54(6), 1344–1352.
- 195.** Rahier J., Loozen S., Goebbels R. M., et al. (1987). The haemochromatic human pancreas: a quantitative immunohistochemical and ultrastructural study. *Diabetologia*, 30 (1), 5–12.
- 196.** Rajapurkar M. M., Hegde U., Bhattacharya A., et al. (2013). Effect of deferiprone, an oral iron chelator, in diabetic and non-diabetic glomerular disease. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(1), 5–10.
- 197.** Ramey G., Deschemin J.C., & Vaulont S. (2009). Cross talk between the mitogen activated protein kinase and bone morphogenetic protein/hemojuvelin pathways is required for the induction of hepcidina by holotransferrin in primary mouse hepatocytes. *Haematol* 94, 765-772.
- 198.** Ramos E., Kautz L., Rodriguez R., et al. (2011). Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology*, 53(4), 1333–1341.
- 199.** Ramos P., Guy E., Chen N., et al. (2011). Enhanced erythropoiesis in Hfe-KO mice indicates a role for Hfe in the modulation of erythroid iron homeostasis. *Blood*, 117(4), 1379–1389.
- 200.** Ramsay A. J., Reid J. C., Velasco G., et al. (2008). The type II transmembrane serine protease Matriptase-2. *Frontiers in Bioscience*, 13(1), 569–579.
- 201.** Ray P., Huang B., & Tsuji Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 24(5), 981–990.
- 202.** Rhodes C. J., Howard L. S., Busbridge M., et al. (2011). Iron deficiency and raised hepcidin in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(3), 300–309.
- 203.** Rishi G., Wallace D. F., & Subramaniam V. N. (2015). Hepcidin: regulation of the master iron regulator. *Bioscience Reports*, 35(3), 1–12.
- 204.** Rivera S., Nemeth E., Gabayan V., et al. (2005). Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood*, 106(6), 2196–2199.
- 205.** Roe M. A., Spinks C., Heath A.-L. M., et al. (2007). Serum prohepcidin concentration: no association with iron absorption in healthy men; and no relationship with iron status in men

Referencias

- carrying HFE mutations, hereditary haemochromatosis patients undergoing phlebotomy treatment, or pregnant women. *British Journal of Nutrition*, 97(03), 544-549.
- 206.** Roque M. E., Sandoval M. J., & Aggio M. C. (2001). Serum erythropoietin and its relation with soluble transferrin receptor in patients with different types of anaemia in a locally defined reference population. *Clinical and Laboratory Haematology*, 23(5), 291–5.
- 207.** Roque M., D'Anna M. C., Gatti, C., et al. (2008). Hematological and Morphological Analysis of the Erythropoietic Regenerative Response in Phenylhydrazine-induced Hemolytic Anemia in Mice. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.*, 35(3), 181–190.
- 208.** Rösen P., Nawroth P. P., King G., et al. (2001). The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 17(3), 189–212.
- 209.** Salazar J., Mena N., & Núñez M. T. (2006). Iron dyshomeostasis in Parkinson ' s disease. *Journal of Neural Transmission*, 71, 205–213.
- 210.** Salazar J., Mena N., Hunot S., et al. (2008). Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(47), 18578–18583.
- 211.** Santambrogio P., Cozzi A., Levi S., et al. (2000). Functional and immunological analysis of recombinant mouse H- and L-Ferritins from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 19: 212–218.
- 212.** Sasaki Y., Noguchi-Sasaki M., Yasuno H., et al. (2012). Erythropoietin stimulation decreases hepcidin expression through hematopoietic activity on bone marrow cells in mice. *International Journal of Hematology*, 96(6), 692–700.
- 213.** Sasu B. J., Li H., Rose M. J., et al. (2010). Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (AI). *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 45(3), 238–245.
- 214.** Schroeder W. H., Dobson M., Kane D. M., et al. (1987). Toxic trace elements associated with airborne particulate matter: a review. *Japca*, 37(11), 1267–1285.
- 215.** Semenza G. L. (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*, 88, 1474–1480.
- 216.** Seymour J.F., & Presneill J.J. (2002) Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 215–235.
- 217.** Shah S. V, Rajapurkar M. M., & Baliga R. (2011). The role of catalytic iron in acute kidney injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6(10), 2329–2331.

Referencias

- 218.** Shah S. V., Baliga R., Rajapurkar M., et al. (2007). Oxidants in Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(1), 16–28.
- 219.** Shayeghi M., Latunde-Dada G. O., Oakhill J. S., et al. (2005). Identification of an Intestinal Heme Transporter. *Cell*, 122(5), 789–801.
- 220.** Shindo M., Torimoto Y., Saito H., et al. (2006). 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*, 35(3), 152–162.
- 221.** Sian-Hülsmann J., Mandel S., Youdim M. B. H., et al. (2011). The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 118(6), 939–957.
- 222.** Simcox J. A., & McClain, D. A. (2013). Iron and diabetes risk. *Cell Metabolism*, 17(3), 329–341.
- 223.** Smith C. P., & Thévenod F. (2009). Iron transport and the kidney. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(7), 724–730.
- 224.** Smith T. G., Talbot N. P., Privat C., et al. (2009). Effects of iron supplementation and depletion on hypoxic pulmonary hypertension: two randomized controlled trials. *Jama*, 302(13), 1444–1450.
- 225.** Soe-Lin S., Apte S. S., Andriopoulos B., et al. (2009). Nramp1 promotes efficient macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5960–5965.
- 226.** Sonnweber T., Nachbaur D., Schroll A., et al. (2014). Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. *Gut*, 63(12), 1951–1959.
- 227.** Stites S.W., Plautz M.W., Bailey K., et al. (1999). Increased concentrations of iron and isoferritins in the lower respiratory tract of patients with stable cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 160: 796–801.
- 228.** Tabuchi M., Yanatori I., Kawai Y., et al. (2010). Retromer-mediated direct sorting is required for proper endosomal recycling of the mammalian iron transporter DMT1. *Journal of Cell Science*, 123(5), 756–766.
- 229.** Tamay de Dios L., Ibarra C., & Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigacion En Discapacidad*, 2(2), 70–78.
- 230.** Taylor K. M., Morgan H. E., Johnson A., et al. (2005). Structure–function analysis of a novel member of the LIV-1 subfamily of zinc transporters, ZIP14. *FEBS Letters*, 579(2), 427–432.
- 231.** Taylor M., Qu A., Anderson E. R., et al. (2011). Hypoxia-inducible factor-2 α mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology*, 140(7), 2044–2055.

Referencias

- 232.** Theil E. C., & Eisenstein R. S. (2000). Combinatorial mRNA Regulation: Iron Regulatory Proteins and Iso-iron-responsive Elements (Iso-IREs). *Journal of Biological Chemistry*, 275(52), 40659–40662.
- 233.** Thiel College Institutional Animal Care and Utilization Committee. Guidelines for Collection of Blood from Laboratory Animals. <https://www.thiel.edu/assets/documents/academics/iacuc/IACUC-guidelines-for-collection-of-blood-from-laboratory-animals.pdf>
- 234.** Thompson A.B., Bohling T., Heires A., et al. (1991) Lower respiratory tract iron burden is increased in association with cigarette smoking, *J. Lab. Clin. Med.*, 117: 493–499.
- 235.** Thompson K., Molina R., Donaghey T., et al. (2006). The influence of high iron diet on rat lung manganese absorption. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 210(1-2), 17–23.
- 236.** Torti F. M., & Torti S. V. (2002). Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, 99(10), 3505–3516.
- 237.** Touret N., Furuya W., Forbes J., et al. (2003). Dynamic traffic through the recycling compartment couples the metal transporter Nramp2 (DMT1) with the transferrin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25548–25557.
- 238.** Trinder, D., Oates, P. S., Thomas, C., et al. (2000). 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*, 46(2), 270–276.
- 239.** Turi J. L., Yang F., Garrick M. D., et al. (2004). The iron cycle and oxidative stress in the lung. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(7), 850–857.
- 240.** Turner P. V, Brabb T., Pekow C., et al. (2011). Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 50(5), 600–613.
- 241.** UFAW, & Royal Society (1987). Guidelines for the care of laboratory animals and their use for scientific purpose I. Housing and care. UFAW, South Mimms, Potters Bar, UK and Royal Society, London, UK.
- 242.** Ulvik, R. J. (2015). The liver in haemochromatosis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology : Organ of the Society for Minerals and Trace Elements*, 31, 219–224.
- 243.** 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*, 282(3), G534–G539.

Referencias

- 244.** Urrutia P. J., Mena N. P., & Núñez M. T. (2014). The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 1–12.
- 245.** Urrutia P., Aguirre P., Esparza A., et al. (2013). Inflammation alters the expression of DMT1, FPN1 and hepcidin, and it causes iron accumulation in central nervous system cells. *Journal of Neurochemistry*, 126(4), 541–549.
- 246.** Valore E. V., & Ganz T. (2008). Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 40(1), 132–138.
- 247.** Vashchenko G., & MacGillivray R. (2013). Multi-Copper Oxidases and Human Iron Metabolism. *Nutrients*, 5(7), 2289–2313.
- 248.** Veuthey T., D’Anna M. C., & Roque M. E. (2008). Role of the kidney in iron homeostasis: renal expression of Prohepcidin, Ferroportin, and DMT1 in anemic mice. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 295(4), F1213–F1221.
- 249.** Vokurka M., Krijt J., Šulc K., et al. (2006). Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiological Research*, 55, 667–674.
- 250.** Voller A., Bartlett A., & Bidwell D. E. (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology*, 31(6), 507–520.
- 251.** Wajant H., & Scheurich P. (2011). TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway. *FEBS Journal*, 278(6), 862–876.
- 252.** Wallander M. L., Leibold E. A., & Eisenstein R. S. (2006). Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(7), 668–689.
- 253.** Wang C. Y., Jenkitkasemwong S., Duarte S., et al. (2012). ZIP8 is an iron and zinc transporter whose cell-surface expression is up-regulated by cellular iron loading. *Journal of Biological Chemistry*, 287(41), 34032–34043.
- 254.** Wang J., & Pantopoulos K. (2011). Regulation of cellular iron metabolism. *Biochemical Journal*, 434(3), 365–381.
- 255.** Wang J., Song N., Jiang H., et al. (2013). Pro-inflammatory cytokines modulate iron regulatory protein 1 expression and iron transportation through reactive oxygen/nitrogen species production in ventral mesencephalic neurons. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(5), 618–625.

Referencias

- 256.** Wang Q., Du F., Qian Z.-M., et al. (2008). Lipopolysaccharide Induces a Significant Increase in Expression of Iron Regulatory Hormone Hepcidin in the Cortex and Substantia Nigra in Rat Brain. *Endocrinology*, 149(8), 3920–3925.
- 257.** Wang R.-H., Li C., Xu X., et al. (2005). A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metabolism*, 2(6), 399–409.
- 258.** Wang W., Song N., Zhang H., et al. (2012). 6-Hydroxydopamine upregulates iron regulatory protein 1 by activating certain protein kinase C isoforms in the dopaminergic MES23.5 cell line. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(11), 1987–92.
- 259.** Wang X., Ghio A. J., Yang F., et al. (2002). Iron uptake and Nramp2/DMT1/DCT1 in human bronchial epithelial cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 282(5), L987–L995.
- 260.** Ward D. M., & Kaplan J. (2012). Ferroportin-mediated iron transport: Expression and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1426–1433.
- 261.** Wareing M., Ferguson C. J., Delannoy M., et al. (2003). Altered dietary iron intake is a strong modulator of renal DMT1 expression. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 285(6), F1050–F1059.
- 262.** Wessling-Resnick, M. (2006). Iron imports. III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(1), 1–6.
- 263.** Wessling-Resnick, M. (2010). Iron Homeostasis and the Inflammatory Response. *Annual Review of Nutrition*, 30(44), 105–122.
- 264.** Wilkinson, N., & Pantopoulos, K. (2014). The IRP/IRE system in vivo: Insights from mouse models. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 1–15.
- 265.** Wolff N. A, Liu W., Fenton R. A, et al. (2011). Ferroportin 1 is expressed basolaterally in rat kidney proximal tubule cells and iron excess increases its membrane trafficking. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(2), 209–219.
- 266.** Wu X.-G., Wang Y., Wu Q., et al. (2014). HFE interacts with the BMP type I receptor ALK3 to regulate hepcidin expression. *Blood*, 124(8), 1335–1343.
- 267.** Xu H., Jiang H., Wang, J., et al. (2010) Rg1 protects the MPP+-treated MES23.5 cells via attenuating DMT1 up-regulation and cellular iron uptake. *Neuropharmacology*, 58(2), 488–494.
- 268.** Yang F., Haile D. J., Wang X., et al. (2005). 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*, 289(1), L14–L23.
- 269.** Yang F., Liu X.-B., Quinones M., et al. (2002). Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39786–39791.

Referencias

- 270.** Yien Y. Y., Gnanapragasam M. N., Gupta R., et al. (2015). Alternative splicing of EKLF/KLF1 in murine primary erythroid tissues. *Experimental Hematology*, 43(1), 65–70.
- 271.** Zechel S., Huber-Wittmer K., & von Bohlen und Halbach O. (2006). Distribution of the Iron-Regulating Protein Heparin in the Murine Central Nervous System. *Journal of Neuroscience Research*, 84(4), 2352–2359.
- 272.** Zhang D., Meyron-Holtz E., & Rouault T. A. (2007). Renal iron metabolism: transferrin iron delivery and the role of iron regulatory proteins. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(2), 401–406.
- 273.** Zhang D.-L., Hughes R. M., Ollivierre-Wilson H., et al. (2009). A Ferroportin Transcript that Lacks an Iron-Responsive Element Enables Duodenal and Erythroid Precursor Cells to Evade Translational Repression. *Cell Metabolism*, 9(5), 461–473.
- 274.** Zhao N., Gao J., Enns C. A., & Knutson, M. D. (2010). ZRT/IRT-like protein 14 (ZIP14) promotes the cellular assimilation of iron from transferrin. *Journal of Biological Chemistry*, 285(42), 32141–32150.
- 275.** Zhao N., Nizzi C. P., Anderson S. A., et al. (2015). Low Intracellular Iron Increases the Stability of Matriptase-2. *Journal of Biological Chemistry*, 290(7), 4432–4446.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

- D'Anna María Cecilia, **Giorgi Gisela**, & Roque Marta. (2011). Studies on Duodenum, Spleen and Liver in Mice: Distribution of Ferroportin and Prohepcidin in an Inflammation Model. *Int. J. Morphol.*, 29(3):747-753.
- Gaona Prieto Suani, Villarraga Muñoz María del Mar, D'Anna María C, **Giorgi Gisela**, Garcia Betina, Mora Bautista Ana Isabel, Castillo Bohórquez Martha, & Roque Marta. (2012). Modelo animal de anemia inducida por flebotomía crónica: Relación funcional entre hierro y eritropoyesis. *NOVA*, 10: 51-63.
- **Giorgi Gisela**, & Marta Roque. (2014). Iron overload induces changes of pancreatic and duodenal divalent metal transporter 1 and prohepcidin expression in mice. *Acta Histochemica*, 116 (2):354-362.
- **Giorgi Gisela**, D'anna María Cecilia, & Roque Marta. (2015) Iron homeostasis and its disruption in mouse lung in iron deficiency and overload. *Exp Physiol*, 100(10):1199-1216.

PRESENTACIONES DE TRABAJOS CIENTÍFICOS EN CONGRESOS INTERNACIONALES

- Roque M.E.; **Giorgi G.**; D'Anna M.C. "*Animal model of chronic anemia in mice: lung expression of dmt1, ferroportin, ferritin and hemochromatosis protein*". 12th FELASA SECAL CONGRESS: Animal Research. Better Science from Fewer Animals. P-206; pages 123-124. Publicado en JAALAS. Junio 2013 Barcelona, Spain.

PRESENTACIONES DE TRABAJOS CIENTÍFICOS EN CONGRESOS NACIONALES

- Veuthey T.V., D'Anna M.C., **Giorgi G.**, Roque M.E. "*Modulación dual de Hepsidina Por Hierro y Anemia*". LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Argentina. Publicado en la revista Medicina 2009; 69 (1): 195.
- D'Anna M.C., Veuthey T.V., **Giorgi G.**, García B., Roque M.E. "*Regulación del Hierro por Hepsidina en Inflamación y Sobrecarga de Hierro*". Primeras Jornadas Bioquímicas del Sudoeste Bonaerense. Bahía Blanca, Argentina. Publicado en la Revista de la Asociación Médica de Bahía Blanca 2009; 19 (1): 24.

- **Giorgi G.**, Veuthey T.V., García B.; Roque M.E. *“Regulación del Transportador de Metales Divalentes en un modelo de Sobrecarga de Hierro y Anemia Aguda”*. LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología 2010 (SAFISOL) y XLII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mar del Plata, Argentina. Publicado en la revista Medicina 2010; 70 (2): 191.
- **Giorgi G.**, D’Anna M.C., Roque M.E. *“Eje Hcpidina-Ferroportina-Eritropoyrtina en un modelo animal de sobrecarga de hierro e hipoxia”*. Segundo Congreso Bioquímico del Sudeste Bonaerense. Mar del Plata, Argentina. Publicado en el libro de resúmenes del Comité Científico del Congreso, resumen P.7 pg. 25, 2011.
- **Giorgi G.**, Petasny M., Roque M.E. *“Expresión duodenal y renal del transportador de metales divalentes en un modelo animal de flebotomía crónica con esplenectomía”*. LVI Reunión Científica de la Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), II Congreso Nacional y IV Reunión Científica Regional por el bienestar del animal de laboratorio y el progreso de la ciencia de la Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AACYTAL). Mar del Plata, Argentina. Publicado en la revista Medicina 2011; 71 (3): 181.
- **Giorgi G.**; Roque M.E. *“Función pulmonar en el ciclo del hierro en un modelo experimental de estrés oxidativo”*. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Rosario, Argentina. Publicado en el libro de resúmenes del Comité Científico del Congreso, resumen 38 pg. 41, 2012.
- **Giorgi G.**; Roque M.E. *“Regulación del ciclo del hierro en estrés oxidativo mediado por DMT1 pancreática y ferritina”*. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Rosario, Argentina. Publicado en el libro de resúmenes del Comité Científico del Congreso, resumen 39 pg. 41, 2012.
- **Giorgi G.**; Roque M.E. *“Expresión pulmonar y hepática del Transportador de Metales Divalentes (DMT1) y de Ferritina en un modelo animal de anemia por flebotomía crónica con y sin esplenectomía”*. LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Argentina. Publicado en la revista Medicina 2012; 72 (2): 134.
- Danna M.C.; **Giorgi G.**; Roque M. *“Regulación de Ferroportina en inflamación crónica en modelos de ratón con y sin expresión de Hcpidina”*. Aceptado y presentado en la LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Reunión Científica Anual 2013 de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS) y XLV Reunión Científica Anual de la sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mar del Plata, Argentina. Publicado en la revista Medicina 2013; 73 (3): 157.

- **Giorgi G.**; Roque M.E. *“Fisiología del hierro en páncreas en un modelo de ratón de sobrecarga de hierro: transportados de metales divalentes 1 y hepcidina”*. Aceptado y presentado en la LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de investigación clínica (SAIC), Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS) y XLV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mar del Plata, Argentina. Publicado en la revista Medicina 2013; 73 (3): 412.
- **Giorgi G.**; Fernandez Delias M.F.; Roque M.E. *“Función del Transportador de Metales Divalentes 1 y ZIP14 (slc39a14) en pulmón en un modelo de sobrecarga de hierro”*. Aceptado y presentado en la LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica LXII (SAIC), Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Argentina. Publicado en la revista Medicina 2014; 74 (3): 255.
- **Giorgi G.**; Roque M.E. *“Modelo de deficiencia de hierro: función de Transportador de Metales Divalentes 1 y ZIP14 (slc39a14) en tejido pulmonar”*. Aceptado y presentado en la LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Argentina. Publicado en la revista Medicina 2014; 74 (3): 255.
- **Giorgi G.**; Agnolazza D.L.; Fernandez Delías M.F.; Roque M.E. *“Estudio de la función pulmonar en deficiencia de hierro en un modelo animal”*. 5° Congreso Interdisciplinario de la Salud de Bahía Blanca. Bahía Blanca, Argentina. Publicado en la revista del 5° Congreso Interdisciplinario de la Salud. Resumen número 22 pag 21, 2015.
- Fernandez Delías M.F; **Giorgi G.**; Agnolazza D.L.; Roque, M.E. *“Respuesta pulmonar al exceso de hierro. Estudio de un modelo animal.”* 5° Congreso Interdisciplinario de la Salud de Bahía Blanca. Bahía Blanca, Argentina. Publicado en la revista del 5° Congreso Interdisciplinario de la Salud. Resumen número 51 pag 25, 2015.
- **Giorgi G.**; Giusto N.M.; Roque M.E. *“Función renal en el balance de hierro”*. Aceptado y presentado en la LX Reunión Científica de la Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Mar del Plata, Argentina. Publicado en la revista Medicina 2015.
- **Giorgi G.**; Urrutia P.; Roque M.E.; Núñez M.T. *“Modulación de proteínas citoplasmáticas que responden al hierro sobre importadores del hierro en células de neuroblastoma humano tratadas con inductores de inflamación y de estrés oxidativo”*. Aceptado y presentado en la LX Reunión Científica de la Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Mar del Plata, Argentina. Publicado en la revista Medicina 2015.

- **Giorgi G.;** Gandini N.A.; Obiol D.J.; Facchinetti M.M.; Curino A.C.; Roque M.E. *“Efecto de la activación de la hemoxygenasa en cáncer de mama sobre la modulación de proteínas que movilizan el hierro celular.”*. Aceptado y presentado en la LX Reunión Científica de la Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Mar del Plata, Argentina. Publicado en la revista Medicina 2015.

BECAS OBTENIDAS

- Beca para PASANTÍAS EN CENTROS DE INVESTIGACIÓN DESTINADAS A JÓVENES DOCENTES. Otorgada por la Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur (UNS).
Fecha de iniciación: 01/03/2015.
Fecha de finalización: 01/05/2015.
Título del Plan: “EFECTO DE ESTÍMULOS INFLAMATORIOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE IRP1 EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO”.
Lugar de trabajo: Laboratorio de Envejecimiento del Depto. de biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Beca Doctoral. Beca de CONICET tipo II.
Fecha de iniciación: 01/04/2014
Título del Plan: “ESTUDIO DE LA MOVILIZACIÓN CELULAR Y SISTÉMICA DEL HIERRO EN ESTADOS FISIOLÓGICOS Y FISIOPATOLÓGICOS”
Lugar de trabajo: Fisiología Humana. BByF. UNS. Director: Dra. Marta Roque.
- Beca Doctoral. BECA DE INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN PARA EGRESADOS. Otorgada por la Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur (UNS).
Fecha de iniciación: 01/04/2011.
Fecha de finalización: 01/04/2014.
Título del Plan: “ESTUDIO DE LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO EN MAMÍFEROS Y SU DESREGULACIÓN: ASPECTOS MOLECULARES Y CLÍNICOS”.
Lugar de trabajo: Fisiología Humana. BByF. UNS. Director: Dra. Marta Roque.
- Beca DE ENTRENAMIENTO PARA ALUMNOS UNIVERSITARIOS. Otorgada por la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC).
Fecha de iniciación: 01/10/2009.
Fecha de finalización: 01/10/2010.
Título del Plan: “EXPORTACION DE HIERRO EN MACROFAGOS DEL SISTEMA RETICULOENDOTELIAL”.
Lugar de trabajo: Fisiología Humana. BByF. UNS. Director: Dra. Marta Roque.

PASANTÍA EN EL EXTERIOR

- Pasantía realizada “EFECTO DE ESTÍMULOS INFLAMATORIOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE IRP1 EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO”
Fecha de iniciación: 01/03/2015.
Fecha de finalización: 01/05/2015.
Director que supervisó las tareas: Marco Tulio Núñez.
Lugar de trabajo: Laboratorio de Envejecimiento del Depto. de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.