

UCH-FC  
MAG - BMCN  
L 433  
C.I



**Facultad de Ciencias**

**Universidad de Chile**

**ROL DE HCP1 Y FLVCR EN LA ABSORCIÓN INTESTINAL  
Y TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE FE HEMÍNICO.**

**Tesis**

**Entregada a la**

**Universidad de Chile**

**en cumplimiento parcial de los requisitos**

**para optar al grado de**

**Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en**

**Biología Molecular, Celular Y Neurociencias**

**Facultad de Ciencias**



**Por**

**Solange Marie Isabelle Le Blanc Soto**

**Diciembre, 2008**

**Santiago - Chile**

**Director de Tesis: Dr. Marco Tulio Núñez González**

**Co-Director de Tesis: Dr. Miguel Arredondo Olguín**

Ext. d Saob 4-12-08.



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER**

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

**SOLANGE MARIE ISABELLE LE BLANC SOTO**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de Agosto del 2008.

Director de Tesis:  
Dr. Marco Tulio núñez:

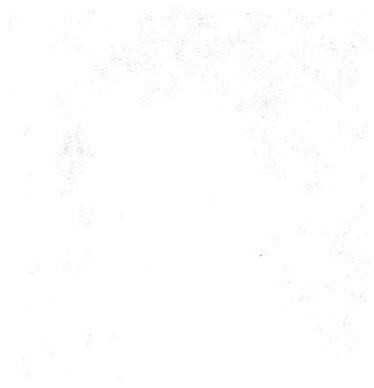
Co-Director:  
Dr. Miguel Arredondo:



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Julio Alcayaga:

Dr. Daniel Wolff:



**"Eres maestro de lo que has vivido,  
artesano de lo que estás viviendo  
y aprendiz de lo que vivirás."**

**Richard Bach**





## AGRADECIMIENTOS

A mis Padres Hugo y Eliana, y a mi hermana Nicole, por su amor incondicional, por haber creído y confiado siempre en mi, y darme las herramientas que me han permitido lograr todas mis metas.

A Percy y Chabe, por su amor y confianza, y por la enorme ayuda que me han dado a lo largo de toda mi vida.

A Cinthia, por todo su apoyo y amistad, por ayudarme a superar los momentos difíciles y compartir los felices. A toda su familia, en especial a la Tía Patty, Tía Marta, y Tamara, por hacerme sentir siempre como un integrante más de su familia.

A mi gran amiga Lore, mi gran compañera, por su amistad incondicional, por estar siempre ahí. A mi amigo Mauro, por sus consejos y por creer siempre en mi.

A todas las personas del Laboratorio de Micronutrientes del INTA, en especial a los amigos que alegran cada día de trabajo: Angélica, Paula, Seba y Valeria. Por todos los momentos felices y por aquellos también estresantes que gracias a su compañía eran más fáciles de sobrellevar.

A Miguel Arredondo, por confiar siempre en mí, por su apoyo, amistad y gran paciencia. Al Dr. Tulio Núñez, por su confianza y guía.

Al Dr. Alcayaga y al Dr. Wolff por sus consejos y correcciones.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS



<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Hipótesis de Trabajo	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos	17
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Materiales</b>	<b>18</b>
2.2.1 Reactivos	18
2.2.2 Equipos	19
2.1.3 Materiales de cultivo	19
2.1.4 Material Biológico	20
<b>2.2 Métodos</b>	<b>21</b>
2.2.1 Cultivo celular	21
2.2.2 Digestión de hemoglobina	21
2.2.3 Obtención de <sup>55</sup> Fe-hem	22
2.2.4 Inhibición de la síntesis endógena de hem	22
2.2.5 Transfección de células Caco-2 con vectores SureSilencing shRNA	22
2.2.6 Ensayos de captación y transporte de <sup>55</sup> Fe-hem	23
2.2.7 Ensayos de transporte de ZnPP	24
2.2.8 Ensayos de transporte de hem	25
2.2.9 Obtención de células Caco-2 sometidas a distintos estímulos con hem y Fe no-hemínico	25
2.2.10 Extracción de RNA de células Caco-2	25
2.2.11 PCR en tiempo-real	26
2.2.12 Extractos celulares	27
2.2.13 Determinación de hem y Fe intracelular	27

2.2.14 Medición de la actividad enzimática de la Hem oxigenasa (HO)	28
2.2.15 Análisis estadístico	28
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
3.1 Determinación de los niveles de expresión relativos de mRNA de HCP1 y FLVCR en células Caco-2 sometidas a un estímulo con hem por distintos tiempos	29
3.2 Efecto de la concentración de hem extracelular en los niveles de expresión relativos de mRNA de HCP1 y FLVCR en células Caco-2	33
3.3 Expresión de mRNA de HCP1 y FLVCR en respuesta a un estímulo de Fe no-hemínico	37
3.4 Transporte transepitelial de hem en células Caco-2	40
3.5 Inhibición de la expresión de HCP1 y FLVCR en células Caco-2	43
3.6 Contenido de hem, Fe total y expresión de mRNA de HO-1 y FLVCR en células Caco-2 HCP1-RNAi	44
3.7 Captación de <sup>55</sup> Fe-hem en células Caco-2 HCP1- RNAi	46
3.8 Contenido de hem, Fe total y expresión de mRNA de HO-1 y HCP1 en células Caco-2 FLVCR-RNAi	49
3.9 Exportación de ZnPP en células Caco-2 FLVCR- RNAi	51
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>54</b>
4.1 Expresión de mRNA HCP1 y FLVCR en respuesta a hem	55
4.2 Transporte transepitelial de hem en células Caco-2	58
4.3 Rol de HCP1 en la captación de hem	59
4.4 Papel de FLVCR en la salida de hem	61



**5. CONCLUSIONES**

**65**

**6. BIBLIOGRAFIA**

**66**



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Contenido de Fe interno (A) y hem interno (B) en células Caco-2 tratadas con hem 50 $\mu$ M a diferentes tiempos	30
Figura 2	Expresión relativa de mRNA y actividad enzimática de HO-1 en el tiempo	31
Figura 3	Expresión relativa de mRNA de HCP1 y FLVCR frente al tiempo de estímulo con hem	32
Figura 4	Contenido de Fe y hem interno en células Caco-2 tratadas con concentraciones crecientes de hem por 12 horas	33
Figura 5	Expresión relativa de mRNA de HO-1 y actividad enzimática en células Caco-2 sometidas a distintas concentraciones de hem por 12 horas	35
Figura 6	Variación de la expresión relativa de mRNA de HCP1 y FLVCR en respuesta a concentraciones crecientes de hem a las 12 horas de estímulo	36
Figura 7	Contenido de Fe y hem intracelular en células Caco-2 expuestas a concentraciones crecientes de Fe no-hemínico por 12 horas	38
Figura 8	Efecto del Fe no-hemínico en la expresión de mRNA de HO-1, HCP1 y FLVCR en células Caco-2 a las 12 horas de estímulo	39
Figura 9	Contenido de hem intracelular en células Caco-2 expuestas a SA 1 mM por diferentes tiempos	41
Figura 10	Transporte de hem en células Caco-2 tratadas con SA 1 mM	42
Figura 11	Porcentaje de inhibición de la expresión de mRNA de HCP1 (A) en las líneas HCP1-RNAi y FLVCR (B) en las líneas FLVCR-RNAi	44

Figura 12	Contenido de Fe (A) y hem intracelular (B) en células Caco-2 HCP1-RNAi	45
Figura 13	Expresión relativa de mRNA de (A) HO-1 y (B) FLVCR en células HCP1-RNAi	46
Figura 14	Captación de <sup>55</sup> Fe-hem por células HCP1-RNAi	47
Figura 15	Captación de <sup>55</sup> Fe-hem por células tratadas con colchicina	48
Figura 16	Contenido de Fe (A) y hem intracelular (B) en células Caco-2 FLVCR-RNAi	50
Figura 17	Expresión relativa de mRNA de (A) HO-1 y (B) HCP1 en células FLVCR-RNAi	51
Figura 18	Salida de ZnPP de células Caco-2 FLVCR-RNAi	52
Figura 19	Porcentaje de ZnPP exportada hacia los compartimientos apical y basolateral	53
Figura 20	Modelo propuesto para la absorción intestinal de hem	64

## ABREVIATURAS

ALA	: δ-aminolevulinato
BSA	: Albúmina sérica de bovino
BVR	: Biliverdina reductasa
cDNA	: Ácido desoxirribonucleico complementario
CP	: Motivo cisteína-prolina
cRNA	: Ácido ribonucleico complementario
DCT1	: Transportador de cationes divalentes 1
DcytB	: Citocromo duodenal B
DEPC	: Dietilpirocarbonato
DMEM	: Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	: Dimetil sulfóxido
DMT1	: Transportador de metales divalentes 1
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
$\epsilon$	: Coeficiente de absorción molar
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
Fe	: Hierro
Fe-NTA	: Hierro-Nitriloacetato
FePP	: Protoporfirina férrica
Fn	: Ferritina
FeLVC	: Virus de leucemia felino, subgrupo C
FLVCR	: Receptor del virus de leucemia felino, subgrupo C
HCP1	: Proteína transportadora de hem 1
HH	: Hemocromatosis hereditaria

HO	: Hem oxigenasa
IMDM	: Medio Dulbecco modificado por Iscove
IRE	: Elemento que responde a hierro
IREG1	: Proteína regulada por hierro 1
IRP	: Proteína reguladora de hierro
kDa	: kiloDalton
MARE	: Elementos de reconocimiento de Maf
MFS	: Superfamilia facilitadora principal
MBq	: Mega Bequerel
mRNA	: Ácido ribonucleico mensajero
MOPS	: Ácido 3-(N-morpholino)propanosulfónico
MTP	: Proteína transportadora de metales
NADPH	: Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
Nramp2	: Proteína de macrófago asociada a resistencia natural 2
Nrf2	: Factor relacionado a NF-E2 2
NTA	: Nitriloacetato
ON	: Over night
pb	: pares de bases
PBS	: Tampón fosfato salino
RNA	: Ácido ribonucleico
RNAi	: RNA de interferencia
rpm	: Revoluciones por minuto
RTf	: Receptor de transferrina
RT-PCR	: Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa

SA	: Succinilacetona
SFB	: Suero fetal bovino
TEER	: Resistencia eléctrica transepitelial
Tf	: Transferrina
ZnMP	: Mesoporfirina de cinc
ZnPP	: Protoporfirina de cinc

## RESUMEN

El hierro (Fe) es un elemento vital para la gran mayoría de los organismos debido a que participa en múltiples procesos metabólicos esenciales. Sin embargo, puede llegar a ser tóxico si se encuentra en exceso. En la dieta, el Fe se encuentra como Fe hemínico o Fe inorgánico. Su absorción ocurre principalmente a nivel de duodeno y es llevada a cabo por células absortivas especializadas, llamadas enterocitos. La captación de Fe hemínico y Fe inorgánico ocurre a través de vías diferentes, las que presentan una eficiente regulación, lo que permite mantener la homeostasis de Fe corporal.

El mecanismo por el cual el Fe hemínico o hem es captado por los enterocitos duodenales ha sido poco estudiado. Recientemente se han identificado dos proteínas involucradas en el transporte de hem: un transportador intestinal de hem denominado HCP1, encontrado en duodeno de ratón, y un exportador de hem en células eritroides humanas, FLVCR. HCP1 se expresa en altos niveles en la línea celular Caco-2, -un modelo de epitelio intestinal humano- y se ha reportado que cuando es sobre-expresado en estas células la absorción de hem aumenta. El rol de FLVCR en el transporte de hem a nivel intestinal no ha sido investigado, pero dado que también se expresa en altos niveles en células Caco-2 posiblemente esté implicado igualmente en la absorción del hem desde la dieta.

Basados en la hipótesis de que las proteínas HCP1 y FLVCR participan en la captación apical y la salida basolateral de hem, respectivamente, investigamos en células Caco-2 el efecto de un estímulo de hem en la expresión de HCP1 y FLVCR, así

como sus funcionalidad en la captación apical, salida basolateral y en el transporte transepitelial de hem. Además, utilizando la técnica de RNA de interferencia para silenciar la expresión de HCP1 y FLVCR, evaluamos la participación de estos en el transporte apical y basolateral de hem.

Nuestros resultados indican que la expresión de HCP1 y FLVCR es regulada negativamente al aumentar la concentración de hem intracelular. Encontramos que muy probablemente HCP1 participa en la captación apical de hem, mientras que FLVCR no parece tener de un rol directo en la salida basolateral de éste. Sin embargo, es posible que FLVCR participe en otros aspectos del metabolismo de hem ya que la inhibición de su expresión produjo la disminución de los niveles de HCP1 y el aumento de los niveles de hem oxigenasa-1. Nuestra observación de que el hem puede atravesar de forma intacta la célula intestinal, indica la existencia de un transportador de salida de hem diferente a FLVCR.

## ABSTRACT

Iron (Fe) is an essential element for most organisms, since it is involved in multiple essential metabolic processes. However, it becomes toxic when it is in excess. In the diet, Fe is found as heme or inorganic Fe, and its absorption is carried out by duodenal enterocytes. The uptake of heme and inorganic Fe occurs through different pathways and both must be highly regulated to maintain body Fe homeostasis.

The mechanism by which heme Fe is taken up by duodenal enterocytes has been scantily studied. Recently, two proteins involved in heme transport have been identified: HCP1, an intestinal heme transporter found in mouse duodenum, and FLVCR, a heme exporter found in human erythroid cells. HCP1 is expressed in high levels in the Caco-2 cell line, a model for human intestinal epithelium, and its over-expression increases heme absorption. The role of FLVCR in intestinal heme transport has not been investigated, but since it is expressed in high levels in Caco-2 cells, FLVCR may also be involved in the absorption of heme from the diet.

Based on the hypothesis that the membrane proteins HCP1 and FLVCR are involved in the apical uptake and the basolateral export of heme, we assessed in Caco-2 cells the effect of a heme stimuli in the expression of HCP1 and FLVCR, as well as their functionality in apical uptake, basolateral exit and transepithelial transport of heme. Moreover, using the technique of interference RNA to silence the expression of HCP1 and FLVCR, we evaluated their participation in apical and basolateral heme transport.

We found that the expression of both HCP1 and FLVCR was negatively regulated by intracellular heme concentration. HCP1 was apparently involved in the apical uptake of heme by Caco-2 cells, while FLVCR does not seem to have a direct role in the basolateral export of heme. Nevertheless, FLVCR may be involved in the metabolism of heme, since its knock-down decreased HCP1 levels and increased heme oxygenase-1 levels. We also found that heme could be transported intact across the intestinal cell, indicating the existence of a heme exporter different to FLVCR.

## 1. INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es el cuarto elemento más abundante sobre la corteza terrestre y el segundo metal más abundante luego del aluminio (Crichton y Charloteaux-Wauters, 1987). Durante la evolución los organismos vivos han seleccionado el hierro para llevar a cabo un gran número de procesos biológicos esenciales. Dentro de los roles vitales del Fe se encuentran el transporte, almacenamiento y activación de oxígeno molecular, transporte de electrones, fosforilación oxidativa, síntesis de nucleótidos y detoxificación celular (Fontecave y Pierre, 1993).

La importancia biológica del Fe es atribuida a sus propiedades químicas de elemento de transición. A pH fisiológico y en medio acuoso, el estado redox del Fe puede variar rápidamente entre Fe(II) y Fe(III). La transferencia de un electrón entre estos estados es llevada a cabo fácilmente; agentes reductores comunes convierten el Fe férrico a Fe ferroso mientras que el oxígeno molecular promueve la reacción reversa. Estas propiedades convierten al Fe en un elemento muy útil en el sitio catalítico de reacciones bioquímicas fundamentales (Crichton y Charloteaux-Wauters, 1987; Aisen y col., 2001).

Por otra parte, estas mismas propiedades químicas hacen del Fe un elemento tóxico si se encuentra en exceso. El Fe(II) es extremadamente sensible al oxígeno, por lo que el Fe libre no unido a proteínas promueve la formación de radicales libres al participar en la reacción de Haber–Weiss–Fenton (Fontecave y Pierre, 1993). En esta secuencia de reacciones el Fe junto con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) genera radicales hidroxilo ( $\bullet OH$ ), probablemente el oxidante más poderoso encontrado en

sistemas biológicos, el cual reacciona con proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, e inicia la peroxidación lipídica (Aisen y col., 2001). Por lo tanto, es de gran importancia mantener la homeostasis de Fe para asegurar el suministro pero a la vez prevenir su acumulación (Hentze y Kühn, 1996).

La deficiencia de Fe es la carencia nutricional más común a nivel mundial, e incluye un amplio espectro de condiciones que van desde una depleción moderada de Fe sin alteraciones fisiológicas hasta anemia por deficiencia de Fe (Burke y col., 2001). Aproximadamente el 15% de la población mundial sufre de este tipo de anemia, cuya prevalencia es de 50% en países en vías de desarrollo y de 10% en países desarrollados (Denic y Agarwal, 2007). La deficiencia de Fe contribuye a disminuir la función inmune y el desarrollo cognitivo, además de estar relacionada con otras patologías (Wessling-Resnick, 2000). Por otra parte, la sobrecarga de Fe conlleva a daño celular y tisular permanente, pudiendo causar serias complicaciones médicas como cirrosis, cáncer de hígado, diabetes, cardiomiopatía y artritis. La sobrecarga es menos común que la deficiencia de Fe y está asociada principalmente a desordenes genéticos, siendo el mejor caracterizado la patología denominada Hemocromatosis Hereditaria (HH). La HH es una enfermedad autosómica recesiva que resulta en una absorción aumentada de Fe desde el tracto gastrointestinal, lo cual provoca una lenta y excesiva acumulación de Fe (Burke y col., 2001).

Un hombre adulto normal posee entre 3 a 4 g de Fe corporal total. El mayor depósito de Fe es el contenido en la hemoglobina en los glóbulos rojos circulantes, el que representa entre un 60 y 70% del Fe corporal total, mientras que sólo un 15% se encuentra formando parte de mioglobina, citocromos y otras enzimas (Fontecave y

Pierre, 1993; Andrews, 2000). Entre un 0,1 y 0,2 % del Fe circula unido a la proteína transportadora Transferrina (Tf), la mayor parte del cual va a la médula ósea para la incorporación del Fe en los precursores eritroides a través de la síntesis de hem. De manera inversa, el Fe es recuperado de la población senescente de eritrocitos a través del sistema retículo-endotelial (Wessling-Resnick, 2000). La mayoría del Fe restante se encuentra unido a proteínas de almacenamiento, como ferritina o hemosiderina, en el bazo e hígado (Swanson, 2003).

El balance corporal de Fe es mantenido principalmente a través de la regulación de su absorción y la conservación de las reservas corporales. A diferencia de lo que ocurre con otros nutrientes, el cuerpo humano carece de un mecanismo de excreción activo de Fe. Diariamente, entre 1 y 2 mg de Fe son excretados por mecanismos inespecíficos como secreciones biliares y urinarias, exfoliación de enterocitos, descamación de la piel y menstruación, ninguno de los cuales es regulado por el nivel corporal de Fe. Al contrario, la absorción de Fe es altamente regulada y generalmente limitada a la recuperación del Fe perdido por estos mecanismos inespecíficos (Wessling-Resnick, 2000; Siah y col., 2006).

El Fe de la dieta está disponible en dos formas básicas, como Fe hemínico u orgánico, presente en carnes rojas y productos derivados, o como Fe no-hemínico o inorgánico, en variadas formas que van desde óxidos y sales hasta complejos orgánicos, cuyas fuentes son cereales, vegetales, frutas, granos y legumbres. El Fe no-hemínico es la forma más predominante, abarcando el 80–90% del Fe de una dieta estándar. Sin embargo, a pesar de que el Fe hemínico representa sólo el 10-20% del Fe presente en la dieta, es absorbido mucho más eficientemente que el Fe no-

hemínico y puede contribuir sobre el 50% al Fe que entra al organismo. El Fe no-hemínico, en cambio, presenta una baja biodisponibilidad, ya que es fuertemente influenciada por otros factores de la dieta (Lombard y col., 1997; Anderson y col., 2005; Sharp y Srai, 2007).

La absorción intestinal de Fe hemínico no compite con la del Fe no-hemínico, indicando que ocurren por vías diferentes (Raffin y col., 1974, Arredondo y col., 2008). Ambas formas de Fe son absorbidas a nivel de intestino delgado, principalmente en el duodeno y parte superior del yeyuno, y es llevada a cabo por los enterocitos de la mucosa intestinal. Los enterocitos se originan a partir de células indiferenciadas de las criptas de Lieberkuhn y migran desde ahí apicalmente a lo largo de la vellosidad durante 2-3 días, período en el cual se diferencian, y son finalmente perdidas por exfoliación y apoptosis (Morgan y Oates, 2002).

La absorción intestinal de Fe no-hemínico consta de tres pasos: (1) entrada a través de la membrana apical de enterocitos, (2) translocación intracelular y (3) salida a través de la membrana basolateral (Chung y Wessling-Resnick, 2003). La mayor parte del Fe dietario que ingresa al tracto gastrointestinal se encuentra en la forma oxidada o férrica (Fe(III)) y dado que esta forma es prácticamente no-biodisponible, debe ser reducida a la forma ferrosa antes de ser absorbida. Además de la reducción de Fe(III) a Fe(II) llevada a cabo por componentes de la dieta como ácido ascórbico y aminoácidos como cisteína e histidina, los enterocitos duodenales poseen actividad ferri-reductasa (Sharp y Srai, 2007), llevada a cabo por la proteína de membrana apical DcytB (**D**uodenal **cy**tochrome **b**), la cual utiliza ascorbato como donador de electrones (McKie y col., 2001). Una vez que el Fe férrico es reducido por agentes reductores de la dieta

o por la DcytB en el lumen intestinal, puede ser incorporado a nivel de membrana apical del enterocito a través del transportador de metales divalentes DMT1 (**Divalent Metal Transporter 1**), también conocido como DCT1 (**Divalent Cation Transporter 1**) o Nramp2 (**Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 2**) (Gunshin y col., 1997; Fleming y col., 1998), el cual transporta Fe(II) y otros metales como Mn(II), Co(II), Cu(I) y Ni(II) utilizando el gradiente de potencial electroquímico de protones como fuente de energía (Arredondo y col., 2003; Garrick y col., 2003).

El Fe que ingresa a los enterocitos puede ser incorporado en la proteína de almacenaje ferritina (Fn) y/o perdido por exfoliación de las células senescentes de las vellosidades intestinales o puede ser transportado hacia la circulación sanguínea (Philpott, 2002). La ferritina es la principal proteína de almacenamiento de Fe, la cual es capaz de secuestrar hasta 4.500 átomos en forma de Fe(III) no-reactivo, previniendo la formación de radicales libres (Mackenzie y col., 2008).

La salida de Fe a través de la membrana basolateral ocurre a través del exportador IREG1 (**Iron Regulated mRNA 1**; McKie y col., 2000), también llamado Ferroportina1 (Donovan y col., 2000) o MTP (**Metal Transporter Protein 1**; Abboud y Haile, 2000). IREG1 transporta Fe(II), el cual debe ser oxidado a Fe(III) para poder unirse a proteínas plasmáticas de transporte de Fe. Esta conversión es catalizada por la ferroxidasa multi-cobre Hefestina, una proteína de unión a membrana homóloga a la ferroxidasa plasmática Ceruloplasmina (Vulpe y col., 1999).

La principal proteína plasmática de transporte de Fe es la transferrina (Tf), la cual puede unir reversiblemente dos átomos de Fe(III) con alta afinidad al pH neutro de la

sangre. El Fe unido a Tf es internalizado por las células vía endocitosis mediada por receptor. Se han identificado dos receptores para la transferrina (TfR): TfR1 (Jandl y col., 1959) y TfR2 (Kawabata y col., 1999), los cuales presentan patrones de expresión distintos; mientras que TfR1 es expresado en un amplio rango de tejidos, la expresión de TfR2 está restringida principalmente a hepatocitos y células intestinales del duodeno (Mackenzie y col., 2008). Una vez que la Tf diférrica se une a su receptor en la superficie celular y el complejo TfR-Tf es endocitado, el Fe(III) es liberado debido al pH ácido del endosoma y luego de ser reducido a Fe(II) puede salir hacia el citosol a través de DMT1 para formar parte del pool de Fe intracelular. La apo-Tf unida aún a su receptor regresa a la superficie celular y es liberada a la circulación para su reutilización (Chung y Wessling-Resnick, 2003)

La cantidad de Fe transportado a través del epitelio intestinal está fuertemente regulada tanto por los niveles como por los requerimientos corporales de Fe y es producto directo de los niveles de expresión de las proteínas de transporte de Fe, particularmente DMT1, DcytB y IREG1 (Frazer y Anderson, 2003; Darshan y Anderson, 2007). Se postula que los niveles basales de expresión de estos transportadores en los enterocitos duodenales maduros dependen de los niveles de Fe circulante unido a Tf, el cual es censado por las células cuando aún se encuentran inmaduras en las criptas de Lieberkühn. Este modelo, llamado modelo de programación de la cripta, propone que la proteína HFE, causante de la mayoría de los casos de HH cuando se encuentra ausente o mutada, se une al TfR favoreciendo la entrada de Fe unido a Tf a la célula, y que la concentración intracelular de Fe alcanzada por este mecanismo determina el nivel de expresión de las proteínas involucradas en su absorción intestinal (Sharp y

Srai, 2007), mediante el sistema IRE/IRP (Iron Responsive Element/Iron Regulatory Protein).

Las proteínas reguladoras de Fe o IRPs (IRP1 e IRP2) son proteínas citosólicas que pueden unirse de manera específica a estructuras en forma de horquilla llamadas elementos de respuesta a Fe o IREs, las que se encuentran presentes en las regiones 5' o 3' no traducidas de varios mRNAs que codifican para proteínas involucradas en la absorción y metabolismo de Fe, tales como DMT1, IREG1, TfR y ferritina. La actividad de unión de IRP a los IREs aumenta cuando los niveles de Fe intracelular disminuyen. Cuando las IRP se unen a los IREs situados en la región 5' de un mRNA, el resultado es una inhibición de la traducción, lo que ocurre en el caso de ferritina. Si los IREs se encuentran en la región 3' del mensajero, la unión de IRPs provoca una estabilización del mRNA aumentando los niveles de proteína. DMT1 y TfR poseen IREs en la región 3' del mRNA, por lo que su expresión aumenta en respuesta a bajos niveles de Fe. Cuando el Fe intracelular aumenta, la unión de IRP a IRE disminuye, aumentando la expresión de ferritina y disminuyendo la de DMT1 y TfR (Eisenstein, 2000; Chung y Wessling-Resnick, 2003). Sin embargo, a pesar de la programación a nivel de la cripta, los enterocitos maduros pueden modificar rápidamente los niveles de expresión de los transportadores de Fe en respuesta a señales humorales, como hepcidina. Hepcidina es un péptido producido por células hepáticas y secretado a la circulación, donde actúa como un inhibidor de la absorción de Fe al disminuir la expresión del transportador apical de Fe, DMT1 (Mena y col., 2008).

La evidencia existente apunta a que ambos mecanismos, tanto el de programación de la cripta como el de hepcidina, contribuyen a la regulación de la

absorción intestinal de Fe, permitiendo detectar el contenido corporal de Fe y resultando en que la absorción sea dependiente de éste (Siah y col., 2006).

### **Absorción intestinal de Fe hemínico**

El hem es la principal forma funcional de Fe en células eucariotas. En mamíferos, contiene aproximadamente el 60% del Fe corporal. Posee roles vitales como grupo prostético de hemoglobina y mioglobina y de muchas enzimas esenciales como citocromos mitocondriales, catalasa, peroxidasa y NO sintasa, así como también participa en la regulación de procesos metabólicos como transcripción, traducción y diferenciación celular (Padmanaban y cols., 1989).

El hem, o Fe-protoporfirina IX (FePP), es una molécula de porfirina que contiene un átomo de Fe en su centro. La porfirina que forma el hem es un tetrapirrol cuadrado plano, en que los cuatro anillos pirrólicos se encuentran unidos por puentes meteno. La conjugación del macro-ciclo tetrapirrólico le otorga el color y la fluorescencia que caracteriza a las porfirinas. Las moléculas de porfirina por si mismas no unen oxígeno ni participan en reacciones oxidativas ni en procesos de transferencia de electrones, estas propiedades le son conferidas al unir un metal de transición divalente, como el Fe en el caso del hem, a través de dos átomos de nitrógeno imino (=N-) y dos nitrógenos pirrólicos (-NH<sub>2</sub>-). Cuando el átomo de Fe se encuentra en su estado ferroso, el complejo es llamado ferro-protoporfirina, protoporfirina ferrosa o hem y es la forma funcional presente en las hemoproteínas, mientras que cuando el Fe se encuentra en su estado férrico se denomina ferri-protoporfirina, protoporfirina férrica o hemina, la

cual posee carga positiva y es aislada generalmente como sal de cloruro (Maines, 1997; Kumar y Bandyopadhyay, 2005).

La absorción intestinal de Fe hem involucra tres pasos: (1) captación apical de la molécula de hem desde el lumen, (2) catabolismo dentro del enterocito y liberación del Fe y (3) salida del Fe hacia la circulación (Oates y West, 2006). El hem proveniente de hemoglobina y mioglobina es liberado por enzimas pancreáticas en el lumen intestinal, quedando estabilizado por los péptidos producidos en la degradación de la globina junto con otros componentes de la dieta, lo cual impide la formación de dímeros y grandes agregados de hem, los cuales no quedan disponibles para la absorción (Conrad y col., 1966). El grupo hem ingresa a los enterocitos como el anillo metalo-porfirínico intacto, por lo que no compite con el Fe no-hemínico por la entrada a las células intestinales. Primero, la molécula de hem se uniría a la membrana apical y sería internalizada, para luego aparecer en vesículas citoplasmáticas (Parmley y col., 1981). Se han propuestos diferentes mecanismos por los cuales la FePP podría atravesar la membrana apical, entre los que se encuentran endocitosis mediada por receptor (Gräsbeck y col., 1979; Galbraith y col., 1985), difusión pasiva a través de la membrana debido a la naturaleza lipídica del hem (Light y Olson, 1990) y entrada por transporte activo, saturable y dependiente de la temperatura, indicativo de un transportador (Worthington y col., 2001; Uc y col., 2004; Arredondo y col., 2008).

La hipótesis del ingreso del hem mediante difusión pasiva ha sido prácticamente descartada. La naturaleza lipídica de las porfirinas hace posible, de hecho, que se asocien con las membranas celulares pero son incapaces de atravesarlas debido a que las cadenas laterales aniónicas de carboxilato presentes en el anillo porfirínico

introducen cargas negativas y no permiten la difusión pasiva a través de la membrana (Krishnamurthy y col., 2007). Por otro lado, si bien existen evidencias de la existencia de un receptor intestinal de hem en cerdos y humanos, éste nunca ha sido identificado (Latunde-Dada y col., 2006a). Sin embargo, se ha observado que la entrada de hem a las células intestinales se ve afectada al alterar la composición de la membrana o interrumpir el tráfico vesicular, indicando que parte del hem dietario podría ingresar a la célula por medio de endocitosis o un proceso pasivo de pinocitosis (Flores, 2006).

Worthington y col. (2001) y Uc y col. (2004) han sugerido que la captación de hem a nivel intestinal es mediada por un transportador localizado en el extremo apical de las células enterocíticas, el cual permite el paso de hem a través de la membrana de manera saturable, competitiva y dependiente de la temperatura. El único transportador de hem hasta ahora identificado con estas características es el descrito por Shayeghi y col. (2005), denominado HCP1 (**Hem Carrier Protein 1**), aislado a partir de duodeno de ratón utilizando la técnica de hibridación sustractiva por supresión.

El gen de HCP1 de ratón está localizado en el cromosoma 11B5, contiene cinco exones, los cuales comprenden 1.942 pb y codifica para una proteína de 54 kDa con 459 aminoácidos. El gen humano está ubicado en el cromosoma 17q11.1, contiene 2.097 pb y codifica para una proteína de 446 aminoácidos de aproximadamente 50 kDa. La proteína es altamente hidrofóbica y se predicen nueve dominios transmembrana, y su secuencia aminoacídica posee un 22% de similitud a los transportadores de tetraciclina bacterianos, miembros de la familia MFS (**M**ajor **F**acilitator **S**uperfamily). El mRNA de HCP1 no posee estructuras IREs ni motivos de unión a hem conocidos. HCP1 presenta una alta expresión en intestino proximal,

principalmente duodeno, y también es expresado en tejidos como hígado y riñón (Shayeghi y col., 2005).

El trabajo de Shayeghi y col. (2005), muestra que al inyectar oocitos de *Xenopus* con cRNA de HCP1 es posible observar un aumento de 2 a 3 veces en la captación de hem, aumento similar al obtenido al infectar células HeLa con adenovirus-HCP1. En ambos casos la captación es un proceso saturable y dependiente de la temperatura. Además, en este trabajo se demuestra el rol de HCP1 en el transporte intestinal de hem en ratón. Utilizando sacos duodenales bloqueados con un anticuerpo específico para HCP1, se observa una fuerte disminución en la captación de  $^{55}\text{Fe}$ -hem. HCP1 muestra además una selectividad para el transporte de hem, ya que no es capaz de transportar tetraciclina, a pesar de la homología de ambos transportadores, o Fe no-hem. Sin embargo, HCP1 también permite la captación de Zn-protoporfirina (ZnPP), un análogo estructural de hem, sugiriendo que el factor esencial en el proceso de transporte es el anillo porfirínico.

De manera interesante, la expresión duodenal de HCP1 no parece estar regulada por la deficiencia o por la sobrecarga sistémica de Fe en ratón. No obstante, al exponer ratones a una condición de hipoxia, lo cual incrementa la absorción de Fe, provoca una marcada inducción del mRNA de HCP1 en duodeno. Pese a no afectar la expresión de HCP1, el estatus de Fe corporal sí parece jugar un rol en su regulación post-traducciona, ya que en ratones normales HCP1 se localiza tanto en la membrana apical como en compartimientos citoplasmáticos, mientras que en ratones deficientes de Fe se observa un marcado aumento de la proteína en la membrana de enterocitos duodenales y una fuerte disminución en compartimientos citoplasmáticos. Lo contrario

ocurre en ratones cargados con Fe, donde HCP1 se acumula en el citoplasma (Shayeghi y col., 2005).

Estudios posteriores de Latunde-Dada y col. (2006b), muestran que el transportador HCP1 se expresa en altos niveles en la línea celular Caco-2, -un modelo de epitelio intestinal humano-, y se localiza predominantemente en la membrana plasmática aunque también se observa su presencia en estructuras vesiculares. Cuando HCP1 es sobreexpresado en estas células la absorción de hem aumenta modestamente, debido posiblemente a la alta expresión endógena y/o a la existencia de un mecanismo regulatorio que prevenga la citotoxicidad causada por un exceso en la absorción de hem (Latunde-Dada y col., 2006b). Sharma y col. (2007), demostraron que el homólogo bovino de HCP1 media el transporte de hem en epitelio retinal. HCP1 interactuaría espacialmente con la vía de captación de hemoglobina en macrófagos humanos, indicando que podría cumplir un rol en el catabolismo de esta proteína y el reciclamiento de hem (Schaer y col., 2008).

A pesar de las evidencias que relacionan a HCP1 con el transporte de hem, se ha propuesto que la función principal de HCP1 sería la de un transportador intestinal de folato, y que constituiría la base molecular de la patología denominada mala-absorción hereditaria de folato (Qiu y col., 2006; Nakai y col., 2007; Inoue y col., 2008).

Una vez dentro de la célula, el hem es degradado por la enzima microsomal Hem oxigenasa (HO; EC 1.14.99.3) con la producción de CO, biliverdina IX $\alpha$  y Fe(II) libre. La biliverdina IX $\alpha$  es un tetrapirrol lineal que es rápidamente reducido al pigmento biliar bilirrubina IX $\alpha$  por la enzima biliverdina IX $\alpha$  reductasa (BVR) (Tenhunen y col., 1968;

Raffin y col., 1974). El Fe(II) liberado ingresa al pool de Fe intracelular, compitiendo con el Fe no-hem, y compartiendo los mismos mecanismos de salida hacia la circulación a través de IREG1.

Tenhunen y col. (1968; 1969), descubrieron la HO en microsomas de bazo, hígado, riñón y médula de rata y describieron el catabolismo de hem. Luego, Maines y col. (1986), caracterizaron dos isoformas de HO en hígado de rata, las que denominaron HO-1 y HO-2. Posteriormente, se aisló una tercera isoforma, llamada HO-3, a partir de cerebro de rata (McCoubrey y col., 1997). Las tres isoformas son producto de genes distintos y solamente la expresión de HO-1 es inducible por hemina y metales pesados como cadmio y cobalto (Maines y col., 1986), mientras que la expresión de HO-2 y HO-3 es relativamente constante.

Todas la isoformas de HO catalizan la oxidación de hem utilizando NADPH, NADPH-citocromo P-450 reductasa, la cual transfiere un electrón desde NADPH a hem y oxígeno molecular ( $O_2$ ). Por cada molécula de hem oxidada se utilizan tres moléculas de  $O_2$  y tres de NADPH. La HO se une al hem en una razón equimolar y la ruptura oxidativa ocurre en el puente  $\alpha$ -metano debido a regulación estérica, según la evidencia entregada por la estructura cristalina del complejo hem-HO (Maines, 1997).

Cable y col. (1993), observaron que la expresión de HO-1 en células Caco-2 es inducida por hem. Los niveles de HO-1 son regulados por su sustrato mediante un mecanismo molecular que involucra al represor transcripcional Bach1. Este represor es capaz de reprimir la transcripción de genes blancos al formar un heterodímero con proteínas de la familia Maf y unirse a elementos de reconocimiento de Maf (MAREs),

presentes en el gen de HO-1 al menos en una copia funcional. Hem es capaz de unirse a Bach1 en los motivos CP (Cisteína-Prolina) presentes en la proteína y regular negativamente la actividad de unión de Bach1-Maf a DNA, lo que anula la represión de la expresión de *ho-1* en presencia de su sustrato (Ogawa y col., 2001; Sun y col., 2002). La secuencia MARE también participa en la activación transcripcional de *ho-1* al unir al heterodímero formado por Nrf2 (NF-E2 Related Factor 2) y una proteína Maf (Alam y col., 1999). Bach1 y Nrf2 competirían por la unión a la proteína Maf y a MARE, por lo que la disponibilidad de uno u otro factor determinaría si la transcripción de HO-1 es reprimida o activada (Shibahara, 2003).

Se ha postulado que parte del hem que ingresa a la célula enterocítica desde el lumen intestinal puede ser transportado directamente hacia la circulación, sin sufrir degradación por HO (Uc y col., 2004; Andrews, 2005; Oates y West, 2006). Estudios realizados en células Caco-2 muestran que existe un mecanismo de transporte activo de hem a través de la membrana basolateral de estas células, sugiriendo la presencia de un exportador (Uc y col., 2004). Quigley y col. (2004) describieron un transportador de hem que se expresa en un amplio rango de tejidos y líneas celulares, siendo su expresión particularmente elevada en células Caco-2, sugiriendo que puede participar en la exportación de hem en enterocitos, tanto del sintetizado endógenamente como del absorbido desde el lumen intestinal.

El exportador de hem descrito por Quigley y col. (2004), fue previamente clonado a partir de una biblioteca de cDNA de linfocitos T humanos y fue denominado FLVCR (Feline Leukemia Virus, subgroup C Receptor), debido a que es el receptor de superficie celular del virus de leucemia felino subgrupo C (Tailor y col., 1999). La

infección de FeLVC (**Feline Leukemia Virus, subgroup C**) causa aplasia pura de glóbulos rojos o aplasia anémica en gatos, en la cual los progenitores eritroides no pueden madurar ni diferenciarse, por lo que la eritropoyesis queda detenida (Quigley y col., 2000). Por lo tanto, la función de FLVCR es esencial para la eritropoyesis, protegiendo a los precursores de un exceso de hem al mediar su exportación (Quigley y col., 2004).

FLVCR, al igual que HCP1, pertenece a la familia MFS. El cDNA de FLVCR codifica para una proteína de 560 aminoácidos con un peso molecular de 60 kDa. Estudios realizados en células de epitelio renal de rata y células hematopoyéticas han mostrado que FLVCR media la extrusión de  $^{55}\text{Fe}$ -hem y de zinc mesoporfirina (ZnMP), un análogo fluorescente de hem, y que la salida de hem de estas células es dependiente de la temperatura (Quigley y col., 2004).

Si bien existe evidencia que involucra a HCP1 en la absorción intestinal de hem en ratón y estudios en células tipo epitelio intestinal que indican que este transportador podría también tener una participación en la absorción intestinal de hem en humanos, aún existen dudas acerca de la relevancia de HCP1 en este proceso. Por otra parte, la participación de FLVCR en el transporte de hem a nivel intestinal no ha sido investigada.

## **HIPOTESIS DE TRABAJO**

Sobre la base de los antecedentes existentes de la participación de HCP1 en la absorción intestinal de hem en ratón y la existencia de un mecanismo activo de transporte de hem a través de la membrana basolateral de células enterocíticas postulamos que: “En células polarizadas tipo epitelio intestinal, las proteínas de membrana HCP1 y FLVCR participan en la captación apical y salida basolateral de hem, respectivamente”.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el rol de HCP1 y FLVCR en el transporte vectorial de hem en células duodenales polarizadas utilizando como modelo de epitelio intestinal la línea celular Caco-2.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar los niveles de expresión relativos de mRNA de HCP1 y FLVCR en células Caco-2 sometidas a estímulos con hem y Fe no-hemínico y su relación con los niveles de expresión de mRNA de HO-1 y concentración intracelular de hem.
  
- b) Determinar si el hem absorbido en la membrana apical de células Caco-2 es capaz de transportarse directamente hacia el extremo basolateral sin sufrir la degradación enzimática mediada por la enzima HO-1.
  
- c) Determinar el efecto del bloqueo de la expresión de HCP1 en la captación de hem en células Caco-2.
  
- d) Determinar el efecto del bloqueo de la expresión de FLVCR en la exportación de hem en células Caco-2.

### 2.1.2 EQUIPOS

Incubadora con inyección de CO<sup>2</sup> (ShellLab), Espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito (SIMAA 6100, Perkin Elmer), Espectrofotómetro UV-visible UV-1601 (Shimadzu), Transluminador UV (Genesys), Baño termorregulado (Mettmert), Termociclador 2720 (Applied Biosystems), Centrífuga 5416 (Eppendorf), Centrífuga refrigerada (Vision), Placa calefactora (Scientific Products), Agitador/calefactor Nuovall (Thermolyne), pHímetro (Oakton), Centrífuga Spectrafuga 16M (Labnet), Balanza Mettler PM 4600 (Delta Range), Bomba de vacío Rocker 300 (Mundolab), Campana de flujo laminar FASTER (Cientec), Contador de centelleo Gamma (Cobra II, Packard), Medidor Volt-Ohm epitelial, Espectrofotómetro GeneQuant (Pharma Biotech), Termociclador LightCycler™ (Roche Diagnostics), Espectrofluorímetro SPECTRAMax M2 (Molecular Divices).

### 2.1.3 MATERIALES DE CULTIVO

- Botellas plásticas de cultivo de 40 mL (25 cm<sup>2</sup>), Orange Scientific.
- Placas de cultivo de 12 pocillos, 22 mm diámetro, Orange Scientific.
- Insertos bicamerales Transwells, con membrana de policarbonato, tamaño de poro de 0,4 µm, 24 mm de diámetro, Costar.
- Pipetas plásticas desechables de 10 mL, Orange Scientific.
- Unidades de filtración, tamaño de poro de 0,2 µm y 0,4 µm, Millipore.
- Jeringas de 5 cc/mL, 10 cc/mL y 20 cc/mL, TERUMO.
- Pipetas pasteur plásticas estériles, TCL.

- Unidades de filtración de 500 mL, Millipore.

#### 2.1.4 MATERIAL BIOLÓGICO

**Animales:** Conejos New Zealand White.

**Línea celular:** Se utilizó Células Caco-2 (American Type Culture Collection HTB37, Rockville, MD), la cual es una de las líneas celulares más usadas para realizar estudios de absorción y metabolismo de Fe. Esta línea deriva de un adenocarcinoma de colon y presenta una diferenciación enterocítica espontánea *in vitro* al alcanzar confluencia. Cuando estas células son crecidas en membranas microporosas muestran características epiteliales, uniones estrechas y expresan enzimas específicas de las microvellosidades de intestino humano, como sucrasa, fosfatasa alcalina y aminopeptidasa (Alvarez-Hernandez y col., 1991). Al alcanzar confluencia, las células Caco-2 muestran dos propiedades esenciales de un epitelio funcional, una resistencia transepitelial medible, la cual refleja la presencia uniforme de uniones estrechas, y una polarización celular apreciable (Grasset y col., 1984). Al ser crecidas en insertos bicamerales exponen su extremo apical hacia el compartimento superior del inserto, mientras que el extremo basolateral queda anclado por la matriz extracelular a la membrana porosa (Halleux y Schneider, 1994). Esto ha permitido estudiar en estas células el transporte vectorial de diversos compuestos y en particular se han utilizado como modelo válido de epitelio intestinal para el estudio del transporte (Alvarez-Hernandez y col., 1991, Follett y col., 2002; Uc y col., 2004) y regulación de la

expresión de genes involucrados en el metabolismo de Fe y hem (Cable y col., 1993; Tallkvist y col., 2000; Uc y Britigan, 2003)

## **2.2 METODOS**

**2.2.1 Cultivo celular.** Las células Caco-2, fueron mantenidas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% suero fetal de bovino (SFB), aminoácidos no esenciales y 100.000 UI de penicilina/estreptomicina, 25 mg/mL de fungizona. Para su propagación, las células fueron sembradas a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en botellas de 25 cm<sup>2</sup> y se crecieron por 7 días a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>, alcanzando confluencia. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco cada 2 días. Luego de este período las células fueron tripsinizadas y resembradas en iguales condiciones.

**2.2.2 Digestión de hemoglobina.** Como fuente de hem se utilizó el producto de una digestión parcial de hemoglobina de bovino, la cual presenta una relación de 0,059 mmoles de hem/mg hemoglobina. Se preparó un homogenizado de hemoglobina a una concentración final de 5 mM hem en agua desionizada, luego, se ajustó el pH a 2 con HCl 6 N. Se agregó una solución de pepsina en HCl 0,1 N (0,5 % final) y se incubó durante 2 horas a 37° C con agitación constante. Luego de finalizada la digestión se ajustó el pH a 6,5 usando NaOH 1 N. Se centrifugó a 3.000 rpm por 10 minutos y se conservó el sobrenadante, el cual se esterilizó por filtración (0,45 µm) antes de ser utilizando. El contenido de Fe en el digerido se determinó por medio de espectrometría

de absorción atómica con horno de grafito, para lo cual el extracto de hem se digirió con igual volumen de ácido nítrico 65 % a 60° C por 16 horas.

**2.2.3 Obtención de <sup>55</sup>Fe-hem.** Dos conejos New Zealand White fueron inyectados en forma intravenosa con 74 MBq de <sup>55</sup>Fe en la forma de FeCl<sub>3</sub> diluido en suero fisiológico. Quince días después los conejos fueron desangrados y las células sanguíneas fueron centrifugadas a 1.000 x g por 15 min a 22° C, obteniéndose así un concentrado de glóbulos rojos, los que fueron lavados con una solución salina y hemolizados por congelamiento. Para la obtención de hemoglobina, este concentrado se incubó con sulfato de amonio 2%, se centrifugó a 20.000 x g por 1 hora a 4° C y se rescató el sobrenadante, el cual fue dializado dos veces contra H<sub>2</sub>O desionizada. Finalmente, la hemoglobina presente en el sobrenadante fue digerida utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente.

**2.2.4 Inhibición de la síntesis endógena de hem.** La síntesis de hem endógena fue bloqueada usando succinilacetona (SA, ácido 4,6-dioxoheptanoico), un inhibidor de la enzima δ-aminolevulinato (ALA) dehidratasa, la cual cataliza la fusión de cuatro moléculas de ALA en un único anillo porfirínico (Ebert y cols., 1979). Las células fueron incubadas en presencia de 1 mM SA por diferentes tiempos o por 48 horas antes de realizar los experimentos de transporte.

**2.2.5 Transfección de células Caco-2 con vectores SureSilencing shRNA.** Para obtener células Caco-2 que presentaran silenciamiento en la expresión de HCP1 o FLVCR, se utilizaron vectores SureSilencing shRNA (SuperArray, Frederick, MD), los cuales disminuyen específicamente la expresión de estos genes mediante RNA de

interferencia (RNAi) y permiten la selección de las células al conferir resistencia a neomicina. Para ello, células Caco-2 sembradas en placas de 12 pocillos en 1 mL de medio DMEM 10% SFB sin antibióticos y crecidas hasta 50-80% de confluencia fueron transfectadas con cuatro vectores específicos para HCP1 o FLVCR, más un vector control negativo, utilizando Lipofectamina LTX. Brevemente, 1 µg de cada vector fue diluido en 200 µL medio DMEM sin suero. Se agregaron 3 µL de Lipofectamina LTX y se incubó por 25 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos DNA-Lipofectamina. Los complejos formados fueron agregados a cada pocillo y las células se incubaron a 37° C en por 4-6 hrs, luego de lo cual el medio fue reemplazado por medio fresco. Luego de 48 horas las células fueron tripsinizadas y resembradas en medio DMEM 10% SFB con 800 µg/mL de Geneticina. Luego de un mes, el medio de selección se reemplazó por DMEM 10% SFB con 400 µg/mL de Geneticina. La disminución de la expresión de HCP1 y FLVCR fue corroborada por PCR en tiempo-real. Las líneas que presentaron un menor porcentaje de expresión de HCP1 o FLVCR fueron utilizadas para los experimentos.

**2.2.6 Ensayos de captación y transporte de <sup>55</sup>Fe-hem.** Para estudiar el rol de HCP1 en la captación apical de hem se utilizó la línea de células Caco-2 HCP1-RNAi obtenida en 2.2.5, la cual presenta una disminución de la expresión de HCP1. Como control se usaron las células Caco-2 transfectadas con un vector negativo. Las células fueron sembradas en insertos bicamerales de 24 mm de diámetro a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/mL en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium suplementado con 10% SFB, aminoácidos no esenciales y 400 µg/mL de Geneticina. La formación de la monocapa se determinó leyendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). A los 10 días de cultivo la integridad de las monocapas fue probada con el test de exclusión de

rojo fenol. Brevemente, las células fueron incubadas por 2 horas con 2 mL de medio IMDM suplementado y que contenía rojo fenol en el compartimiento apical y con 2 mL de medio IMDM suplementado libre de rojo fenol en el compartimiento basolateral. El porcentaje de difusión del rojo fenol fue determinado midiendo la absorbancia a 546 nm. Se utilizaron sólo los insertos con un porcentaje menor al 5% para realizar los experimentos. Para ello, las células se incubaron por diferentes tiempos (0-120 min) con 100  $\mu\text{M}$   $^{55}\text{Fe}$ -hem o distinta concentración (0-200  $\mu\text{M}$   $^{55}\text{Fe}$ -hem) por 90 min en tampón de transporte (MOPS-Na 50 mM; NaCl 94 mM; KCl 74 mM;  $\text{MgCl}_2$  0,74 mM;  $\text{CaCl}_2$  1,5 mM; Glucosa 5 mM; pH 6,0) en el compartimiento apical. El experimento se detuvo lavando los insertos con PBS-EDTA (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4,3 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3) frío, y las células fueron removidas usando Tris salino-EDTA (Tris-HCl 40 mM; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; pH 7,5). Se midió la radioactividad tanto en las células como en el medio basolateral en un contador de centelleo líquido.

**2.2.7 Ensayos de transporte de ZnPP.** Para estudiar el rol de FLVCR en el transporte basolateral de hem se utilizó la línea de células Caco-2 FLVCR-RNAi obtenida en 2.2.5, la cual presenta una disminución de la expresión de FLVCR. Como control se usaron las células Caco-2 transfectadas con un vector negativo. Estas células fueron cultivadas en insertos bicamerales como se describió anteriormente. Las células se incubaron con 50  $\mu\text{M}$  del análogo de hem Zn-protoporfirina (ZnPP) por 30 min en el compartimiento apical y luego fueron lavadas con PBS-BSA ((NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4,3 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM, BSA 10 mg/mL, pH 7,3). Las células fueron dejadas con buffer de transporte en ambos compartimientos por 30 o 60 min. Posteriormente, las células fueron soltadas con Tris-EDTA y la concentración

intracelular de ZnPP fue determinada fluorométricamente, al igual que el transporte hacia el medio apical y basolateral. El transporte se expresó como pmoles/mg proteína.

**2.2.8 Ensayos de transporte de hem.** Células Caco-2 fueron cultivadas en insertos bicamerales como se describió anteriormente. Las células se incubaron con diferentes concentraciones de hem (0-250  $\mu$ M) por 6 horas en el compartimiento apical y el transporte de hem hacia el medio basolateral se determinó espectrofotométricamente a 408 nm en un espectrofotómetro UV/visible. El transporte se expresó como nmoles/mg proteínas/tiempo.

**2.2.9 Obtención de células Caco-2 sometidas a distintos estímulos con hem y Fe no-hemínico.** Para analizar la expresión de HCP1 y FLVCR en respuesta a hem o Fe no-hemínico, células Caco-2 fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, y crecidas por 7 días a 37° C y 5% CO<sub>2</sub> en medio IMDM suplementado. Como fuente de hem se utilizó un digerido de hemoglobina y como fuente de Fe no hemínico se utilizó FeCl<sub>3</sub>-NTA en una relación molar 1:2. En cada caso, se agregó directamente la fuente de Fe al medio de cultivo en las concentraciones indicadas.

**2.2.10 Extracción de RNA de células Caco-2.** Se aisló RNA total de células Caco-2 utilizando reactivo TRIzol según las indicaciones del fabricante (Chomczynski y Sacchi, 1987). Brevemente, células crecidas por 7 días en placas de 12 pocillos fueron lavadas dos veces con PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM, pH 7,3) y luego lisadas directamente en las placas agregando 350  $\mu$ L de TRIzol. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min para permitir la disociación de los complejos

núcleo-proteínas. El lisado fue traspasado a tubos de 1,5 mL y se agregaron 70 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se centrifugó a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. Aproximadamente el 40% de la fase acuosa fue traspasado a un nuevo tubo. Se agregaron 175 µL de isopropanol para precipitar el RNA y se centrifugó a 12.000 x g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado fue lavado con 500 µL de etanol 75% en H<sub>2</sub>O-DEPC. Se centrifugó a 7.500 x g por 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el RNA fue resuspendido en 30 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC y guardado a -20 °C hasta ser utilizado. El RNA fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro GeneQuant.

**2.2.11 PCR en tiempo-real.** 80 ng de RNA fueron utilizados para realizar un PCR cuantitativo de 1-paso utilizando el sistema LightCycler™ con el kit Absolute™ MAX QRT-PCR SYBR® Green Capillary Mix y partidores específicos para:

- HCP1: ATGGTTCTGCAGCTCAGCATCT y CGTGATAGTGGCAAAGGCAAA
- FLVCR: GGTATCCACCAAGTCAGG y CCGTCTATTCTTTGTGGC
- HO-1: CTTCTTCACCTTCCCCAACA y GCTCTGGTCCTTGGTCTCAT
- β-actina: ATCGTCCACCGCAAATGCTTCT y TGTCACCTTCACCGTTCCAGTT.

Simultáneamente se analizaron las curvas de hibridación para detectar formación de dímeros de partidores y la especificidad de cada amplificado. Los ciclos de temperatura fueron: 10 seg a 95° C, 10 seg a 60-65° C y 15 seg a 72° C. Los resultados de cada PCR fueron analizados utilizando el Light Cycler3 Analysis software Version 3.5. Los niveles relativos de RNA fueron cuantificados usando curvas estándar externas y los niveles de expresión de HCP1, FLVCR y HO-1 fueron normalizados por actina. Los cambios en los niveles de mRNA fueron analizados por significancia por

ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas significativas si  $P < 0,05$ .

**2.2.12 Extractos celulares.** Células Caco-2 crecidas en placas de 12 pocillos fueron lavadas 3 veces con PBS 1x y luego soltadas de los pocillos con 1 mL de Tris salino-EDTA e incubadas a 37° C por 10 min. Las células se traspasaron a tubos de 1,5 mL, fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 30 seg y tratadas con 35  $\mu$ L de buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, BSA 0,2%, Tritón X-100 1%, PMSF 2  $\mu$ M e inhibidores de proteasas 1%). Se incubó en hielo por 15 minutos y se centrifugó a 14000 rpm. El sobrenadante fue traspasado a un tubo nuevo y se diluyó con el mismo volumen de Tris salino (Tris-HCl 40 mM, NaCl 100 mM). La concentración de proteínas en el extracto fue determinada por el método de Lowry y col. (1951) a partir de alícuotas de 5  $\mu$ L en duplicado. Las muestras fueron guardadas a -20° C hasta ser utilizadas.

**2.2.13 Determinación de hem y Fe intracelular.** Para determinar la concentración intracelular de hem se utilizó un ensayo de fluorescencia de hem, en el cual el Fe del hem es removido utilizando ácido oxálico y la protoporfirina resultante es cuantificada por fluorescencia. A 30  $\mu$ L de extracto celular se agregaron 500  $\mu$ L de ácido oxálico 2 M. 250  $\mu$ L de esta mezcla fueron calentados a 100° C por 30 min y el volumen restante fue utilizado como blanco. 200  $\mu$ L de muestra y de blanco fueron cargados en placas de 96 pocillos opacas y se determinó la fluorescencia emitida a 662 nm al excitar a 400 nm en un espectrofluorímetro. A cada muestra se le sustrajo la fluorescencia de su respectivo blanco y la concentración de hem fue determinada a partir de una curva de calibración utilizando un estándar de hemina 1 mM en DMSO.

La concentración de hem se expresó como pmoles de hem/mg proteína. La concentración intracelular de Fe total fue determinada mediante espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (Simaa 61000, Perkin Elmer) a partir de una mezcla 1:1 de extracto celular con ácido nítrico 65%, la cual fue incubada a 60° C ON.

**2.2.14 Medición de la actividad enzimática de la Hem oxigenasa (HO).** Para determinar la actividad HO total en un extracto de células Caco-2, se determinó la formación de bilirrubina a partir de hemina. Para ello, se utilizó 100  $\mu$ L de extracto de células Caco-2, los cuales se incubaron con 600  $\mu$ L de Buffer B ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM, pH 7,4 ajustado con KOH 1 M), 100  $\mu$ L de hemina 150  $\mu$ M, 100  $\mu$ L de biliverdina reductasa (extracto crudo de hígado de rata) 100  $\mu$ g/mL y 100  $\mu$ L de NADPH 1 mM por 1 hora a 37° C en oscuridad. La bilirrubina formada se extrajo con 1 mL de cloroformo por 1 hora a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 530 nm ( $\epsilon_{\text{bilirrubina}} = 43,5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). La actividad enzimática se expresó como nmoles de bilirrubina  $\cdot$  mg proteína total<sup>-1</sup>  $\cdot$  hr<sup>-1</sup>.

**2.2.15 Análisis estadístico.** Las variables fueron medidas en duplicados como mínimo y los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. Análisis de ANOVA de una vía y ANOVA de dos vías (tiempo, concentración e interacción) y Test de Student fueron usados para las comparaciones entre cada tratamiento. Los resultados se expresaron como promedios  $\pm$  DE. Las diferencias fueron consideradas significativas si  $P < 0,05$ .

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 MATERIALES

#### 2.1.1 REACTIVOS

**Generales:** HCl, cloroformo, isopropanol, etanol, ácido nítrico, NaCl, NaOH, sulfato de amonio, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Glucosa, KOH, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, ácido oxálico, CuSO<sub>4</sub>, Tartrato de Na y K, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck); Hemina, Zn-protoporfirina, succinilacetona, Pepsina, MOPS, Triton X-100, NTA, DMSO, NADPH (Sigma); Tris, BSA (Winkler); EDTA, medio LB, medio LB-agar (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY); Ultraflúor (National Diagnostics).

**Cultivo Celular:** Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium); Medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium); tripsina-EDTA, fungizona/penicilina/estreptomina, suero fetal bovino (SFB); aminoácidos no esenciales (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY); Geneticina (Invitrogen).

**Biología Molecular:** SureSilencing shRNA (SuperArray, Frederick, MD); Lipofectamina LTX (Invitrogen); Geneticina, TRizol (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY), DEPC (Merck); Absolute™ MAX QRT-PCR SYBR® Green Capillary Mix (Abgene); cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma)

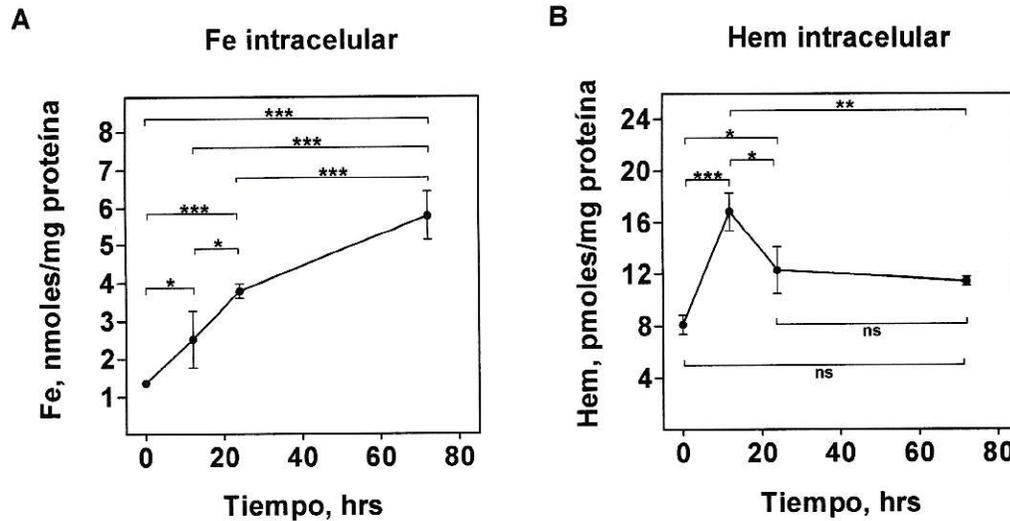
**Radioisótopos:** <sup>55</sup>Fe.

### 3. RESULTADOS

#### **3.1 Determinación de los niveles de expresión relativos de mRNA de HCP1 y FLVCR en células Caco-2 sometidas a un estímulo con hem por distintos tiempos.**

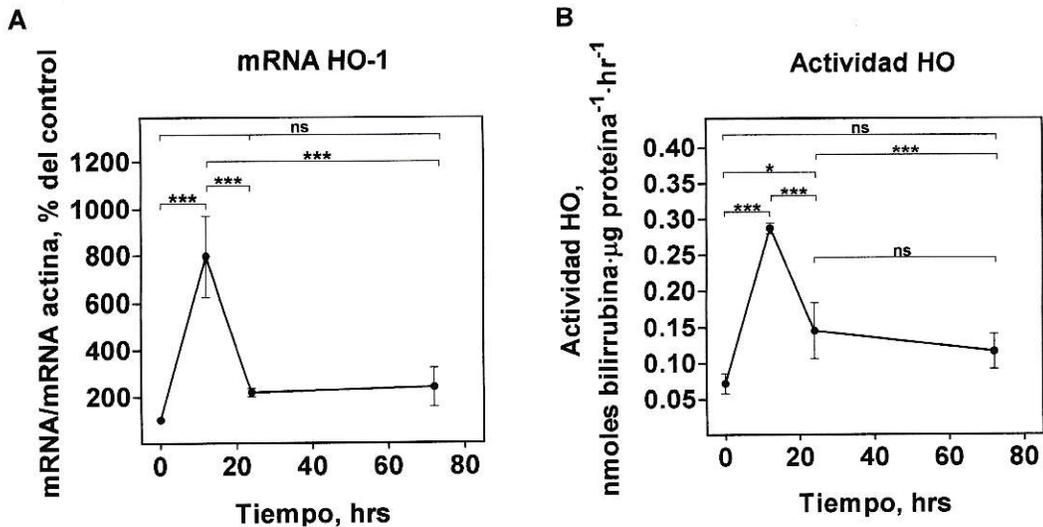
Para determinar si un estímulo de hem afecta la expresión de los genes posiblemente implicados en su metabolismo, células Caco-2 fueron incubadas con una concentración de hem extracelular 50  $\mu$ M, a partir de un digerido de hemoglobina, y se cuantificaron los niveles relativos de mRNA de HCP1, FLVCR y HO-1 a diferentes tiempos de estímulo.

La hemoglobina utilizada como fuente de hem fue efectivamente absorbida por estas células, como se corroboró al medir el contenido de Fe interno, el que aumentó al incrementar el tiempo de exposición a hem, desde  $1,36 \pm 0,07$  nmoles/mg proteína en el tiempo basal hasta  $5,78 \pm 0,64$  nmoles/mg proteína para las 72 horas de estímulo con hem extracelular (ANOVA una vía, F: 56,75;  $p < 0,0001$ ; Figura 1A). Además, se determinó el contenido de hem intracelular en estas células, el cual alcanza su mayor valor de  $16,87 \pm 1,45$  pmoles/mg proteínas a las 12 horas de estímulo y luego va disminuyendo a medida que el tiempo aumenta (ANOVA una vía, F: 26,14;  $p < 0,001$ ; Figura 1B).



**Figura 1. Contenido de Fe interno (A) y hem interno (B) en células Caco-2 tratadas con hem 50  $\mu$ M a diferentes tiempos.** El nivel de Fe intracelular total fue determinado a partir de extractos celulares por medio de espectrometría de absorción atómica. El contenido interno de hem se determinó mediante un ensayo fluorescente de hem a partir de extractos celulares. (Promedio  $\pm$  DE. n=3; ANOVA una vía, Bonferroni post-test: \* p<0,05; \*\*\* p<0,001).

Al determinar los niveles relativos de expresión de Hem oxigenasa 1 (HO-1), observamos que la abundancia relativa del mRNA de HO-1 alcanza un máximo a las 12 hrs., llegando a un  $796,9 \pm 171,9$  %, es decir, cerca de 8 veces la expresión basal (ANOVA una vía, F: 25,80; p<0,001), para luego disminuir al aumentar el tiempo de exposición a hem, alcanzando valores cercanos a los basales (Figura 2A). Los niveles de expresión de mRNA de HO-1 se correlacionan directamente con su actividad enzimática (Figura 2B). Este resultado implica que el hem absorbido por estas células es capaz de modificar la expresión de genes blanco, como HO-1.

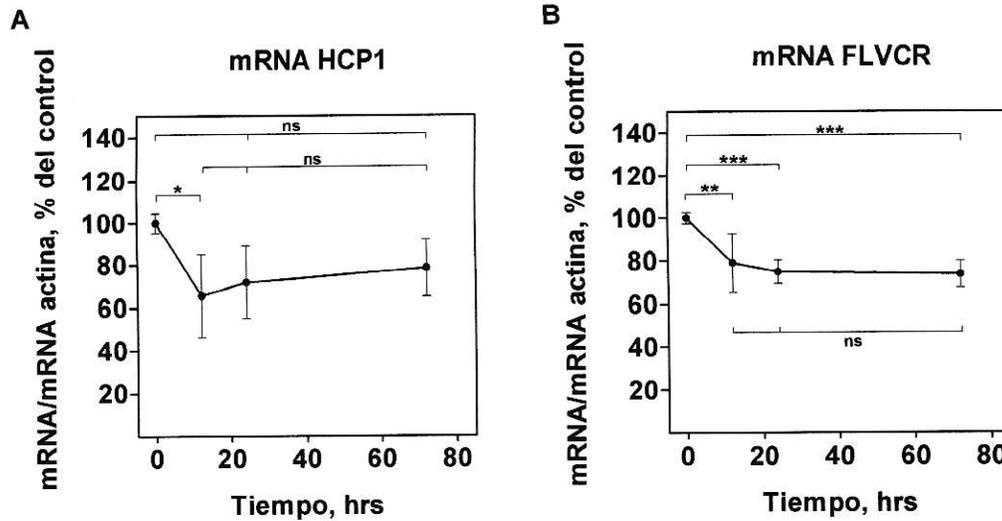


**Figura 2. Expresión relativa de mRNA y actividad enzimática de HO-1 en el tiempo.**

**(A)** Células Caco-2 fueron tratadas por diferentes tiempos con hem 50  $\mu$ M y los niveles relativos de mRNA de HO-1 con respecto a actina fueron determinados por RT-PCR cuantitativo. Los resultados fueron expresados como porcentaje del nivel de mRNA de células control no tratadas con hem. **(B)** La actividad de enzimática de la Hem oxigenasa en un extracto celular se determinó a partir de la formación de bilirrubina en presencia de hemina y biliverdina reductasa. (Promedio  $\pm$  DE. n=3; ANOVA una vía, Bonferroni post-test:

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

El mRNA del transportador HCP1 mostró una variación en su expresión contraria al mRNA de HO-1, es decir, a las 12 hrs. de estímulo con hem disminuyó su expresión con respecto al basal, alcanzando un  $65,6 \pm 19,5$  % de expresión (ANOVA una vía, F: 4,17;  $p < 0,05$ ). Al aumentar el tiempo de exposición, la expresión del transportador no presentó diferencias significativas con respecto al basal (Figura 3A).



**Figura 3. Expresión relativa de mRNA HCP1 y FLVCR frente al tiempo de estímulo con hem.** Células Caco-2 fueron tratadas por diferentes tiempos con hem 50  $\mu$ M y los niveles relativos de mRNA de **(A)** HCP1 y **(B)** FLVCR con respecto a actina fueron determinados por RT-PCR cuantitativo. Los resultados fueron expresados como porcentaje del nivel de mRNA de células control no tratadas con hem. (Promedio  $\pm$  DE. n=6; ANOVA una vía, Bonferroni post-test: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001)

La expresión del mRNA de FLVCR mostró una leve disminución frente a la exposición a hem, la cual se mantuvo en el tiempo, llegando a ser de  $73,6 \pm 6,3$  % para un estímulo de 72 horas (ANOVA una vía, F: 11,50; p< 0,001; Figura 3B).

Estos resultados sugieren que la expresión del mRNA de HCP1 y FLVCR varía frente a un estímulo de hem, disminuyendo la abundancia del mRNA de ambos genes. Para el caso de HCP1, al igual como ocurre para HO-1, la variación se observa a las 12 horas de estímulo, mientras que para FLVCR la disminución de la expresión se mantiene en el tiempo.

### 3.2 Efecto de la concentración de hem extracelular en los niveles de expresión relativos de mRNA de HCP1 y FLVCR en células Caco-2.

Dado que un estímulo de 12 horas con hem induce variaciones en la expresión de HCP1 y FLVCR, se determinó el efecto de la concentración de hem extracelular en la expresión relativa de HCP1 y FLVCR a las 12 horas de estímulo. Como era esperado, el contenido de Fe interno aumentó al incrementar la concentración de hem extracelular, desde  $1,40 \pm 0,04$  nmoles/mg proteína para el basal hasta  $5,33 \pm 0,50$  para una concentración de hem extracelular  $80 \mu\text{M}$  (ANOVA una vía,  $F: 22,10$ ;  $p < 0,001$ ; Figura 4A).

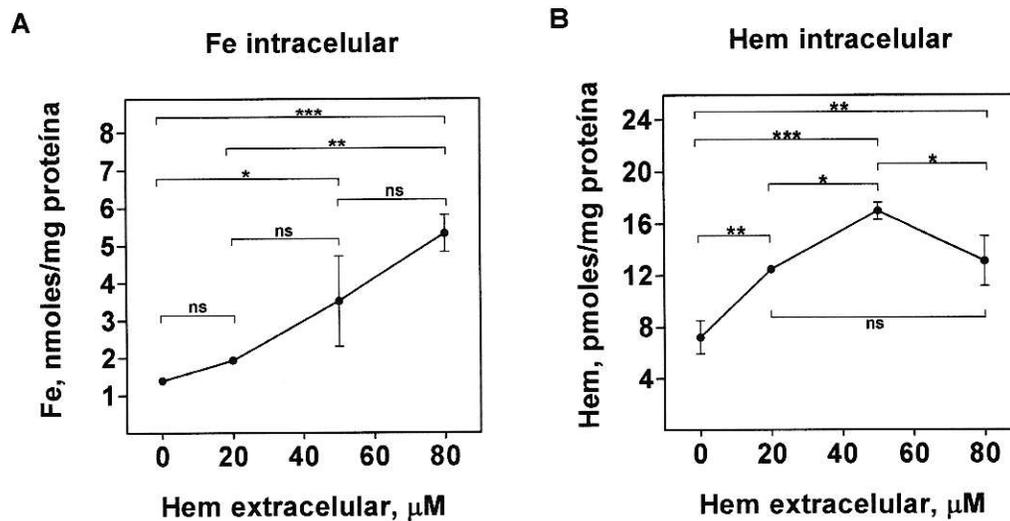
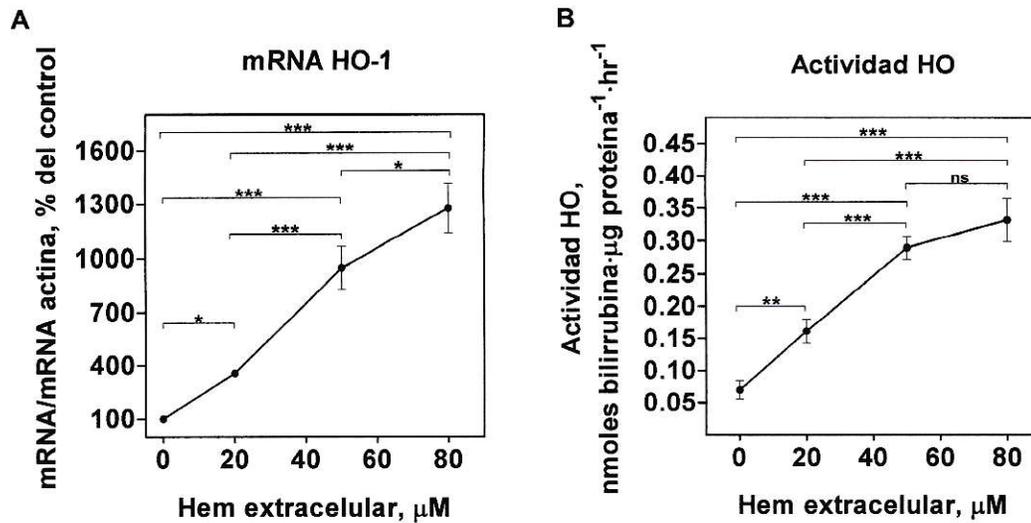


Figura 4. Contenido de Fe y hem interno en células Caco-2 tratadas con concentraciones crecientes de hem por 12 horas. (A) Contenido de Fe intracelular total. (B) Contenido interno de hem. (Promedio  $\pm$  DE.  $n=3$ ; ANOVA una vía, Bonferroni post-test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

El contenido intracelular de hem en cambio, llegó a un máximo de  $17,00 \pm 0,65$  pmoles/mg proteína para hem extracelular  $50 \mu\text{M}$ , para luego disminuir cuando la concentración extracelular de hem fue de  $80 \mu\text{M}$  a  $13,14 \pm 1,94$  pmoles/mg proteína (ANOVA una vía, F: 33,07;  $p < 0,001$ ; Figura 4B).

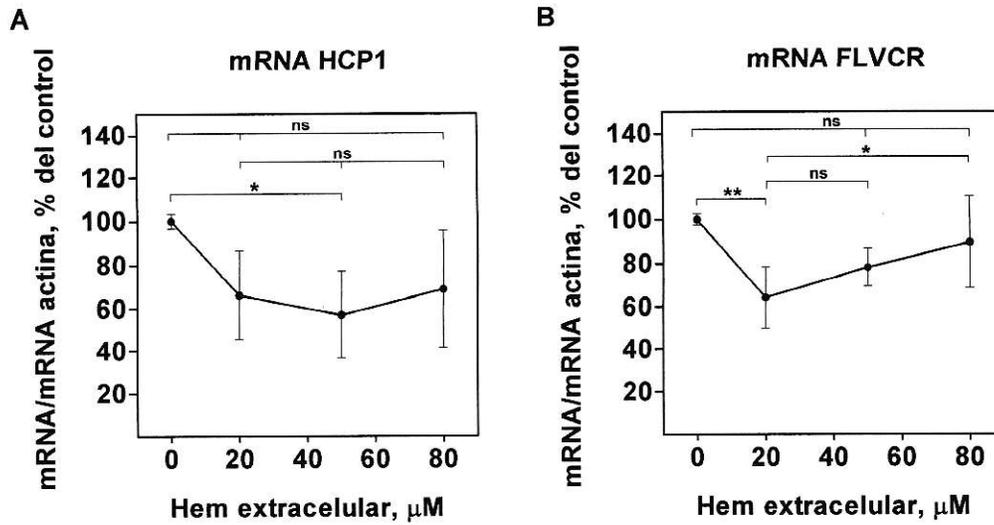
La expresión relativa del mRNA de HO-1 aumentó significativamente en presencia de hem, este aumento en los niveles de mRNA fue dependiente de la concentración (Figura 5A). A una concentración de hem extracelular  $80 \mu\text{M}$  la expresión relativa del mRNA aumentó a  $1276 \pm 138 \%$ , más de 12 veces la expresión del basal (ANOVA una vía, F: 135,9;  $p < 0,0001$ ). Este aumento en los niveles de mensajero se correlacionó con un incremento en la actividad enzimática de HO (Figura 5B).

La expresión relativa del mRNA de HCP1 a las 12 horas de estímulo disminuyó para una concentración de hem extracelular  $50 \mu\text{M}$ ; al  $57,0 \pm 20,3 \%$  (ANOVA una vía, F: 5,05;  $p < 0,05$ ; Figura 6A).



**Figura 5. Expresión relativa de mRNA de HO-1 y actividad enzimática en células Caco-2 sometidas a distintas concentraciones de hem por 12 horas. (A) Expresión relativa de HO-1 a concentraciones crecientes de hem extracelular (B) Actividad enzimática de HO en función de la concentración de hem extracelular. (Promedio  $\pm$  DE. n=3; ANOVA una vía, Bonferroni post-test: \* p < 0,05; \*\* p < 0,05; \*\*\* p<0,001).**

En el caso de FLVCR, la disminución la expresión del mRNA se observó para una concentración de hem extracelular 20  $\mu\text{M}$ , llegando a  $64,1 \pm 14,4 \%$ , pero a concentraciones mayores de hem los niveles de mensajero no presentaron diferencias con respecto al basal (ANOVA una vía, F: 6,93; p<0,01; Figura 6B).

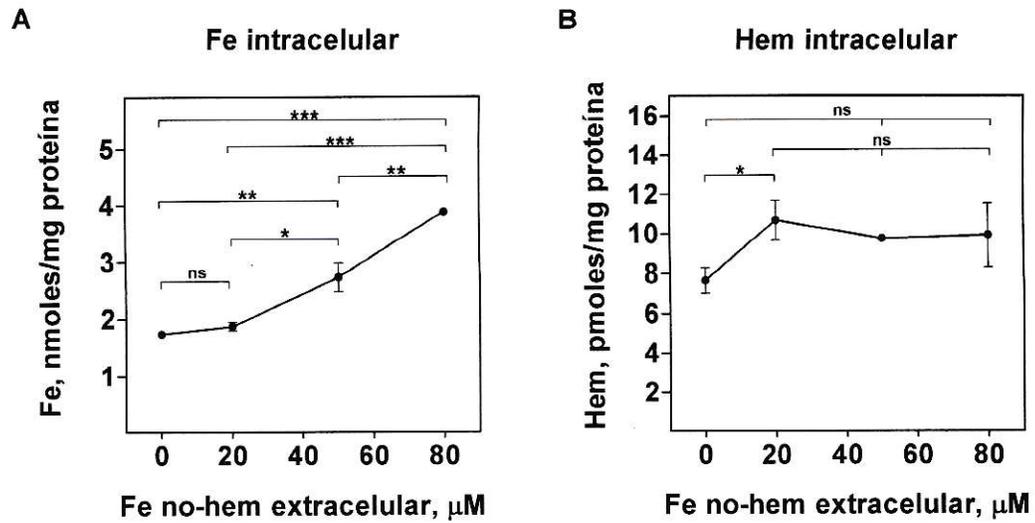


**Figura 6. Variación de la expresión relativa de mRNA de HCP1 y FLVCR en respuesta a concentraciones crecientes de hem a las 12 horas de estímulo. (A) HCP1. (B) FLVCR. (Promedio  $\pm$  DE. n=6; ANOVA una vía, Bonferroni post-test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )**

Estos resultados indican que, para un estímulo de 12 horas, la variación en la expresión del mRNA de HCP1 y FLVCR depende de la concentración de hem extracelular, y que para HCP1, la disminución de la expresión del mRNA se observa a la concentración de hem extracelular con la cual se alcanza el mayor contenido intracelular de hem, 50  $\mu\text{M}$ .

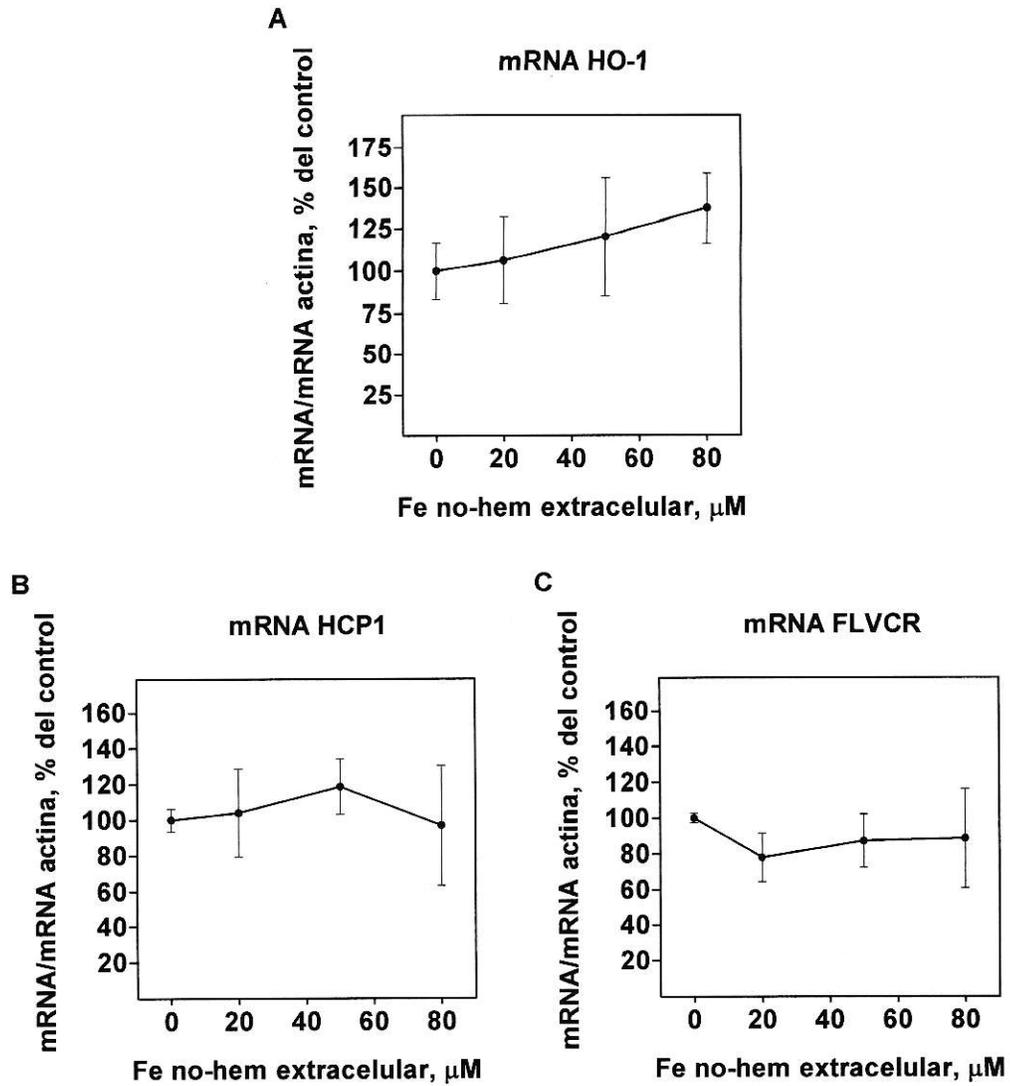
### **3.3 Expresión de mRNA de HCP1 y FLVCR en respuesta a un estímulo de Fe no-hemínico.**

Los resultados anteriores muestran que al exponer células Caco-2 a hem extracelular se produce una variación en la expresión de HCP1 y FLVCR, y que esta variación es dependiente de la concentración de hem extracelular. Además, la respuesta observada, principalmente para HCP1, se relaciona de manera inversa con el contenido interno de hem y no con el de Fe total. Para descartar la posibilidad de que el Fe no-hemínico pueda provocar cambios a nivel transcripcional en HCP1 y FLVCR, se incubaron células Caco-2 con distintas concentraciones de Fe-NTA (1:2) por 12 horas y se determinó el efecto en los niveles de mensajero. Producto del estímulo, estas células aumentan su contenido de Fe interno a medida que la concentración de Fe extracelular se incrementa (ANOVA una vía, F: 114,2;  $p < 0,001$ ; Figura 7A). Además, se encontró un aumento significativo en los niveles de hem intracelular, pero sólo para una concentración de Fe no-hem 20  $\mu\text{M}$  (ANOVA una vía, F: 4,98;  $p < 0,05$ ; Figura 7B).



**Figura 7. Contenido de Fe y hem intracelular en células Caco-2 expuestas a concentraciones crecientes de Fe no-hemínico por 12 horas. (A) Contenido de Fe intracelular total. (B) Contenido interno de hem. (Promedio  $\pm$  DE. n=3; ANOVA una vía, Bonferroni post-test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).**

En la expresión relativa del mRNA de HO-1, si bien se observó un aumento a mayores concentraciones de Fe no-hemínico, éste es mucho menor al observado para un estímulo con hem, y no fue estadísticamente significativo. Para HCP1 y FLVCR no se observaron efectos significativos en respuesta a la exposición a Fe no-hemínico (Figura 8), como sí ocurrió para los estímulos con hem.

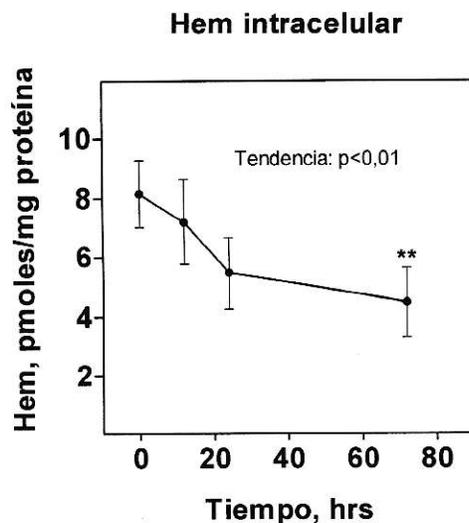


**Figura 8. Efecto del Fe no-hemínico en la expresión de mRNA de HO-1, HCP1 y FLVCR en células Caco-2 a las 12 horas de estímulo. Expresión relativa de (A) HO-1, (B) HCP-1 y (C) FLVCR. (Promedio  $\pm$  DE. n=6; ANOVA una vía = NS).**

### 3.4 Transporte transepitelial de hem en células Caco-2.

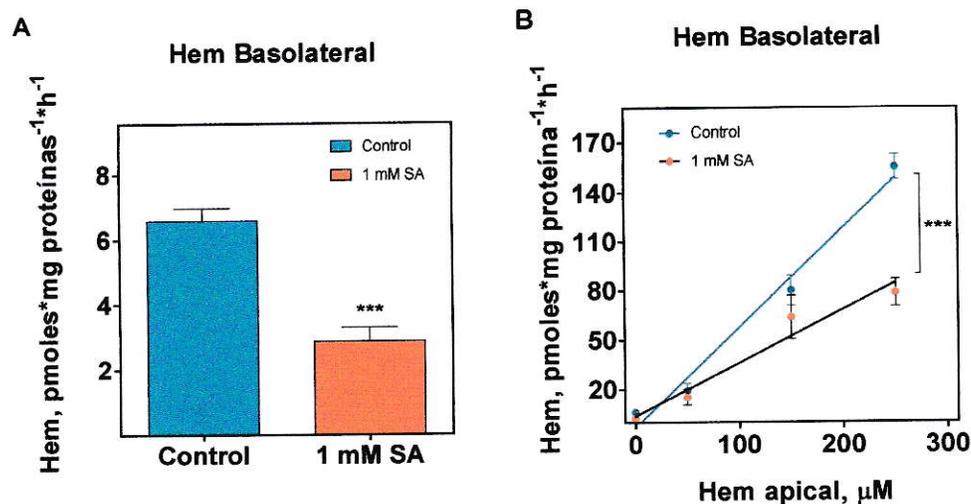
Aún existe controversia sobre si la molécula de hem captada apicalmente es capaz de realizar una transcitosis desde compartimientos apicales hasta la membrana basolateral y ser exportada de las células de manera intacta. Para estudiar esta posibilidad se utilizó el inhibidor de la síntesis *de novo* de hem, succinilacetona (SA, ácido 4,6-dioxoheptanoico) para eliminar la posible contribución del hem sintetizado por las células Caco-2 endógenamente. La SA inhibe el paso enzimático mediado por la enzima  $\delta$ -aminolevulinato (ALA) dehidratasa, segunda enzima de la ruta biosintética del hem, la que cataliza la fusión de cuatro moléculas de ALA en un único anillo porfirínico (Ebert y col., 1979). Al incubar células Caco-2 con SA 1 mM en el medio de cultivo, la concentración de hem intracelular disminuyó en el tiempo (ANOVA una vía; F: 5,02,  $p < 0,05$ . Figura 9), indicando que éstas células sintetizan hem de manera activa.

En células Caco-2 que fueron incubadas por 48 horas con 0 (control) o 1 mM SA se determinó el transporte de hem hacia el medio basolateral. Se observó que existe transporte de hem a través de la membrana basolateral de las células, atribuible a hem sintetizado endógenamente, el cual disminuyó de  $6,59 \pm 0,40$  pmoles $\cdot$ mg proteínas $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$  a  $2,88 \pm 0,42$  pmoles $\cdot$ mg proteínas $^{-1}\cdot$ h $^{-1}$  producto del tratamiento (Figura 10A).



**Figura 9. Contenido de hem intracelular en células Caco-2 expuestas a SA 1 mM por diferentes tiempos.** El contenido interno de hem se determinó mediante un ensayo fluorescente de hem a partir de extractos celulares. (Promedio  $\pm$  DE. n=3; ANOVA una vía, post-test de tendencia: \*\*  $p<0,01$ ).

Cuando estas células se incuban con diferentes concentraciones apicales de hem, las células tratadas con SA presentaron una diferencia significativa en el transporte de hem (ANCOVA,  $p<0,0001$ ; Figura 10B), siendo menor en estas células que en las células control.



**Figura 10. Transporte de hem en células Caco-2 tratadas con SA 1 mM. (A)** Transporte basal de hem hacia el medio basolateral en células Caco-2 controles y tratadas por 48 horas con 1 mM SA (Promedio  $\pm$  DE.  $n=3$ . t-Student: \*\*\*  $p<0,001$ ). **(B)** El transporte de hem en células Caco-2 controles y tratadas por 48 horas con 1 mM SA para diferentes concentraciones de hem apical (Promedio  $\pm$  DE;  $n=3$ ; ANCOVA: \*\*\*  $p<0,001$ ).

A pesar de la disminución observada en el transporte de hem en las células tratadas con SA con respecto a las células sin tratar, en estas células existe un aumento considerable en el transporte a mayores concentraciones apicales de hem, indicando que parte del hem captado a nivel apical es capaz de transportarse de manera intacta hasta la membrana basolateral y ser exportado.

### 3.5 Inhibición de la expresión de HCP1 y FLVCR en células Caco-2.

Los resultados obtenidos muestran que los niveles de mRNA de HCP1 y FLVCR varían en respuesta a cambios en la concentración intracelular de hem, lo cual indica que ambos genes estarían relacionados con el metabolismo de hem. Con el objetivo de investigar el rol de HCP1 y FLVCR en la captación y salida de hem, respectivamente, en células tipo epitelio intestinal, se utilizó la técnica de RNA de interferencia para lograr el silenciamiento de la expresión de HCP1 o FLVCR. Para ello, células Caco-2 fueron transfectadas con 4 vectores distintos para cada gen, los cuales expresan un fragmento de RNA pequeño en horquilla (shRNA) específico que permite el silenciamiento de la expresión, además de un vector control negativo. Los clones positivos fueron seleccionados y a partir de ellos se generaron 4 líneas estables para cada gen (HCP1-RNAi 1-4 y FLVCR-RNAi 1-4). La inhibición de la expresión fue confirmada luego de 1 mes de selección mediante RT-PCR en tiempo real. Para las líneas HCP1-RNAi, el análisis de la expresión relativa de HCP1 mostró que las líneas 1 y 4 presentaban una inhibición significativa de su expresión, la cual fue de  $58,1 \pm 15,5$  y  $66,8 \pm 10,4$  % respectivamente (Figura 11A). Para FLVCR-RNAi en cambio, todas las líneas presentaron una inhibición significativa de la expresión de FLVCR, entre 49 a 37 % de expresión (Figura 11B). Para los experimentos posteriores, se seleccionaron las líneas HCP1-RNAi 1 y FLVCR-RNAi 4.

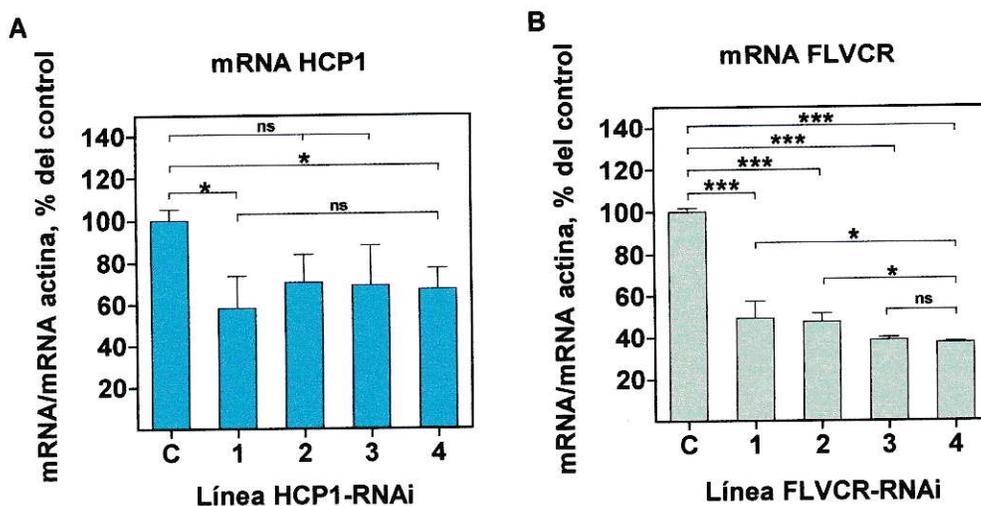
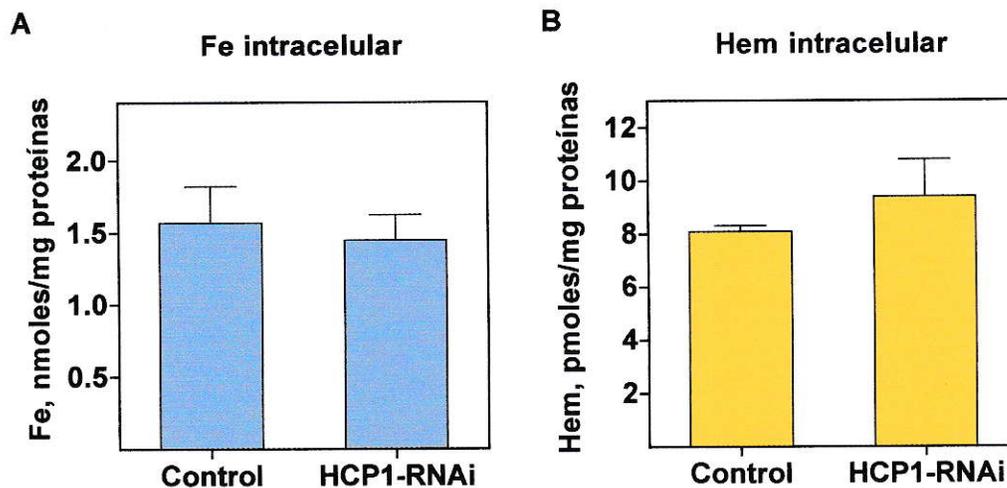


Figura 11. Porcentaje de inhibición de la expresión de mRNA de HCP1 (A) en las líneas HCP1-RNAi y FLVCR (B) en las líneas FLVCR-RNAi. Los niveles relativos de mRNA de HCP1 y FLVCR en las líneas de células Caco-2 RNAi generadas fueron determinados mediante RT-PCR cuantitativo. Los resultados fueron expresados como porcentaje del nivel de mRNA de células control C, transfectadas con un vector negativo. (Promedio  $\pm$  DE. n=3; ANOVA una vía, Bonferroni post-test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 3.6 Contenido de hem, Fe total y expresión de mRNA HO-1 y FLVCR en células Caco-2 HCP1-RNAi.

En la línea seleccionada para los transfectantes HCP1-RNAi, se evaluó el efecto de la inhibición de la expresión de HCP1 en el contenido intracelular de hem y Fe total. En estas células, incubadas con medio basal, el nivel de Fe intracelular no presenta diferencias significativas comparado con el control (Figura 12A). Con respecto a la concentración de hem intracelular, si bien mostró un aumento en las células HCP1-

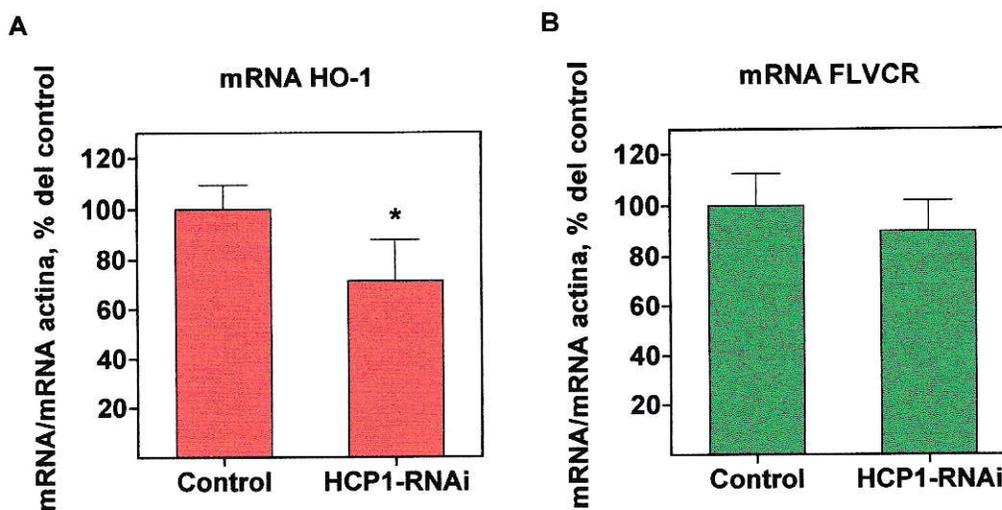
RNAi con respecto a las células control, éste no fue estadísticamente significativo (Figura 12B).



**Figura 12. Contenido de Fe (A) y hem intracelular (B) en células Caco-2 HCP1-RNAi.**

El nivel de Fe intracelular total fue determinado a partir de extractos celulares por medio de espectrometría de absorción atómica. El contenido interno de hem se determinó mediante un ensayo fluorescente de hem a partir de extractos celulares. (Promedio  $\pm$  DE. n=3; t-Student: NS).

En estas condiciones de cultivo, la inhibición de la expresión de HCP1 mostró un efecto significativo en la expresión del mRNA de HO-1, la cual fue de  $71,3 \pm 16,8 \%$ , lo que representa una disminución cercana a un 30% con respecto al control (Figura 13A). La expresión del mRNA de FLVCR, en tanto, fue de  $90,2 \pm 11,8 \%$ , por lo que no mostró variación significativa con respecto al control (Figura 13B).

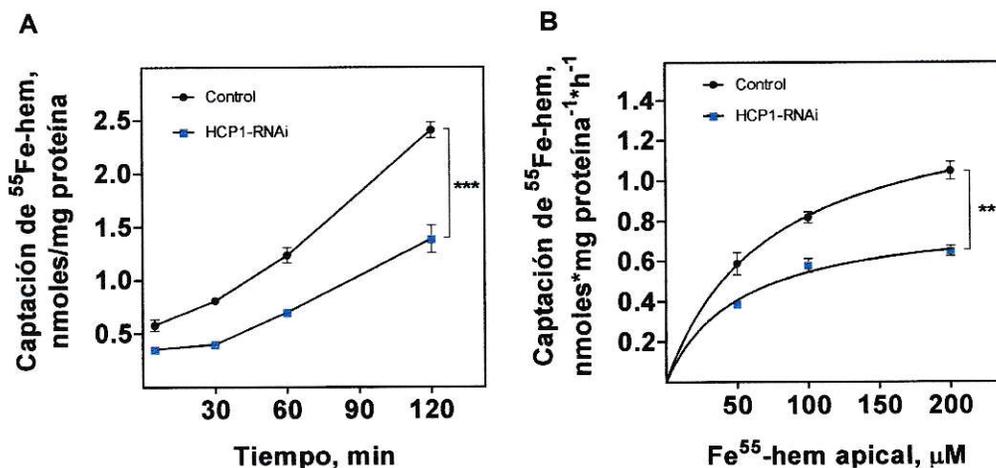


**Figura 13. Expresión relativa de mRNA de (A) HO-1 y (B) FLVCR en células HCP1-RNAi.** Los niveles relativos de mRNA de HO-1 y FLVCR en células Caco-2 HCP1-RNAi fue determinada mediante RT-PCR cuantitativo. (Promedio  $\pm$  DE. n=3; t-Student: \* p<0,05).

### 3.7 Captación de $^{55}\text{Fe}$ -hem en células Caco-2 HCP1-RNAi.

Para estudiar la participación de HCP1 en la captación de hem a nivel de membrana apical, células Caco-2 fueron sembradas en insertos bicamerales por 12 días y se realizaron ensayos de captación de  $^{55}\text{Fe}$ -hem. Las células HCP1-RNAi incubadas por diferentes períodos de tiempo, mostraron una captación de  $^{55}\text{Fe}$ -hem menor a las células controles para todos los tiempos estudiados (ANOVA dos vías; F: 58,97; p<0,0001; Figura 14A). La captación de  $^{55}\text{Fe}$ -hem entre los 5 y 120 minutos para las células HCP1-RNAi aumentó desde  $0,35 \pm 0,02$  a  $1,39 \pm 0,13$  nmoles/mg proteína, respectivamente, mientras que para las células controles en iguales periodos de tiempo aumento desde  $0,58 \pm 0,05$  a  $2,40 \pm 0,07$  nmoles/mg proteína, respectivamente.

De la misma manera, las células HCP1-RNAi, incubadas con diferentes concentraciones de  $^{55}\text{Fe}$ -hem en el medio, mostraron una menor captación de  $^{55}\text{Fe}$ -hem con respecto a las células controles a medida que las concentraciones de  $^{55}\text{Fe}$ -hem aumentan (ANOVA dos vías;  $F: 12,55$ ;  $p < 0,01$ ; Figura 14B). En las células HCP1-RNAi la captación aumentó desde  $0,39 \pm 0,01$  a  $0,65 \pm 0,03$  nmoles/mg proteína $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  entre 50 y 200  $\mu\text{M}$  de  $^{55}\text{Fe}$ -hem en el medio apical, respectivamente, mientras que las células controles la captación aumentó de  $0,59 \pm 0,06$  a  $1,05 \pm 0,04$  nmoles/mg proteína $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  en iguales concentraciones.

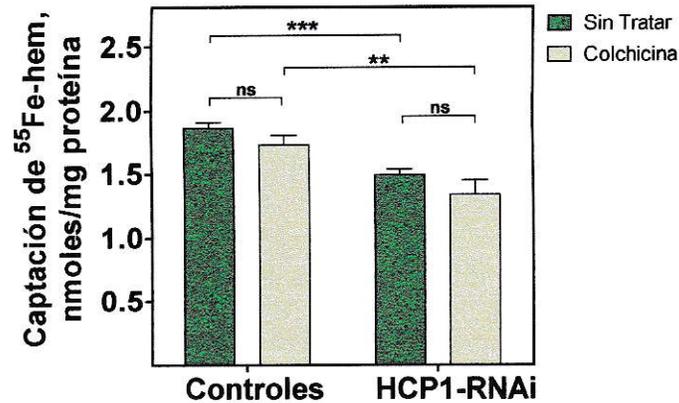


**Figura 14. Captación de  $^{55}\text{Fe}$ -hem por células HCP1-RNAi. (A) Curso temporal de la captación de  $^{55}\text{Fe}$ -hem (200  $\mu\text{M}$ ) (B) Cinética de Michaelis-Menten para la captación de  $^{55}\text{Fe}$ -hem. (Promedio  $\pm$  DE.  $n=3$ ; ANOVA dos vías: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).**

Al analizar la captación según la cinética de Michaelis-Menten, se obtuvo que las células HCP1-RNAi presentaron una  $K_m$  de  $51,89 \pm 10,06$   $\mu\text{M}$  mientras que la  $K_m$  de las células controles fue de  $72,28 \pm 10,63$   $\mu\text{M}$ . La  $V_{\text{max}}$  disminuyó de  $1,42 \pm 0,07$

nmoles/mg proteína<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> a  $0,83 \pm 0,05$  nmoles/mg proteína<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> en las células HCP1-RNAi, indicando que éstas células alcanzan una menor velocidad de transporte que las células controles, producto de la menor cantidad de transportador en la membrana.

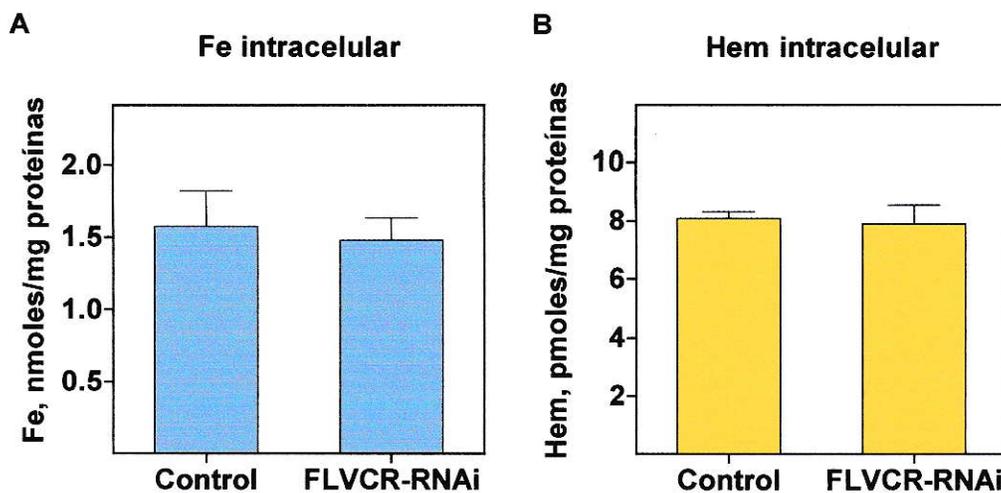
Se ha postulado que el hem puede ser captado por las células Caco-2 mediante endocitosis o pinocitosis (Galbraith y col., 1985). Experimentos anteriormente realizados en nuestro laboratorio muestran que la captación de hem se ve afectada al interrumpir el tráfico vesicular (Flores, 2006). Con el propósito de inhibir la endocitosis y pinocitosis, se realizó un experimento de captación de <sup>55</sup>Fe-hem en células HCP1-RNAi y células controles utilizando colchicina. Este compuesto es un inhibidor selectivo del ensamblaje de microtúbulos, el que reacciona con el dímero de tubulina impidiendo que estos se integren al microtúbulo en formación. Al incubar las células con 200 µM <sup>55</sup>Fe-hem se observó una ligera disminución de la captación con el tratamiento con colchicina, tanto en células controles como en HCP1-RNAi, pero en ambos casos no fue un efecto significativo (Figura 15).



**Figura 15.** Captación de  $^{55}\text{Fe}$ -hem por células tratadas con colchicina. Células HCP1-RNAi y controles fueron incubadas por 30 min con colchicina  $10\ \mu\text{M}$  previo a realizar el experimento de captación. Las células fueron incubadas con  $200\ \mu\text{M}$   $^{55}\text{Fe}$ -hem apical por 60 min y se determinó la captación en un contador de centelleo líquido (Promedio  $\pm$  DE.  $n=3$ ; ANOVA dos vías, Bonferroni post-test: \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ).

### 3.8 Contenido de hem, Fe total y expresión de mRNA de HO-1 y HCP1 en células Caco-2 FLVCR-RNAi.

Al evaluar el efecto de la inhibición de la expresión de FLVCR en el contenido intracelular de Fe total no se encontraron diferencias significativas entre células FLVCR-RNAi y células control. Además, la inhibición de la expresión de FLVCR no afectó el contenido de hem interno en las células FLVCR-RNAi (Figura 16).



**Figura 16.** Contenido de Fe (A) y hem intracelular (B) en células Caco-2 FLVCR-RNAi. El nivel de Fe intracelular total fue determinado a partir de extractos celulares por medio de espectrometría de absorción atómica. El contenido interno de hem se determinó mediante un ensayo fluorescente de hem a partir de extractos celulares. (Promedio  $\pm$  DE. n=3; t-Student: NS).

Las células FLVCR-RNAi presentaron una expresión del mRNA de HO-1 de alrededor de 1,5 veces la de las células control (Figura 17A), mientras que la expresión del mRNA de HCP1 alcanzó un 66 % (Figura 17B).

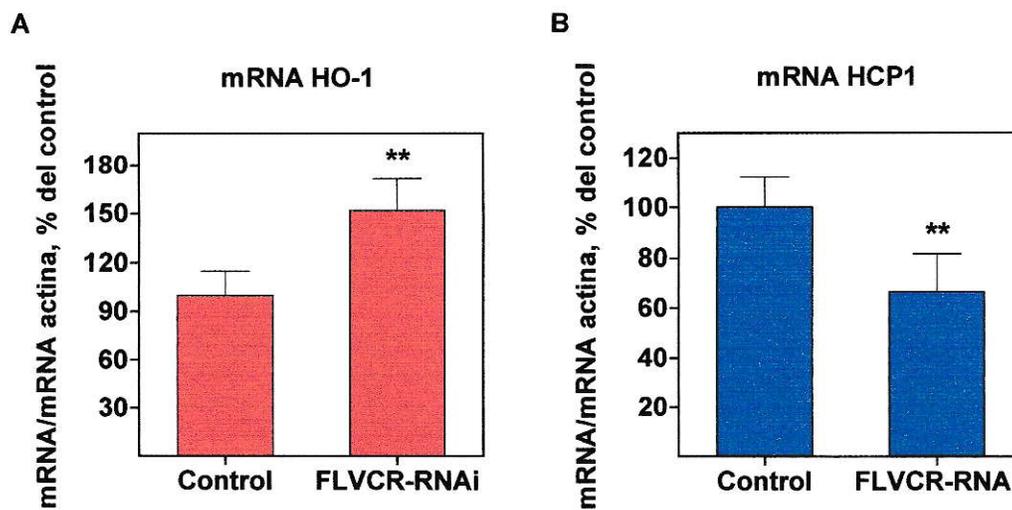
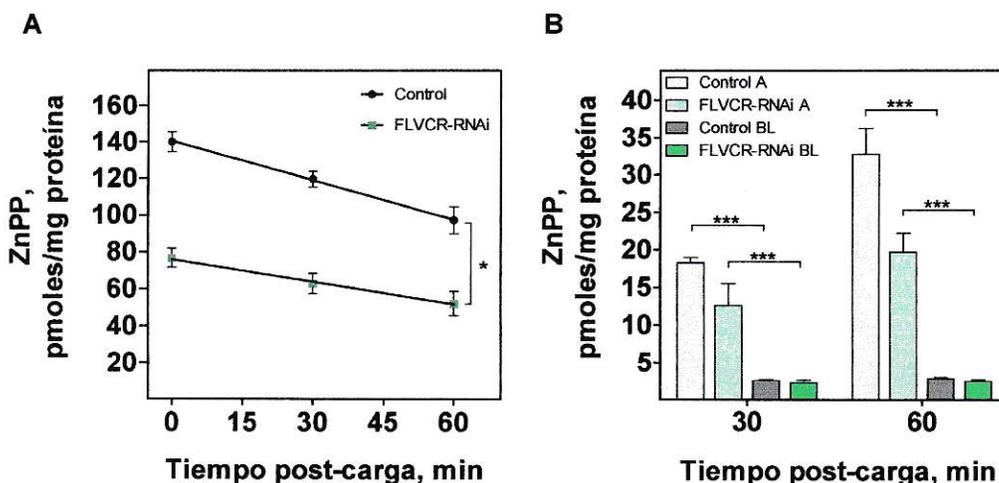


Figura 17. Expresión relativa de mRNA de (A) HO-1 y (B) HCP1 en células FLVCR-RNAi. Los niveles relativos de mRNA de HO-1 y HCP1 en células Caco-2 FLVCR-RNAi fue determinada mediante RT-PCR cuantitativo. (Promedio  $\pm$  DE. n=3; t-Student: \*\* p<0,01).

### 3.9 Exportación de ZnPP en células Caco-2 FLVCR-RNAi.

Para estudiar el rol de FLVCR en la salida de hem de células Caco-2, se utilizó el análogo estructural de hem ZnPP, el cual no puede ser degradado por la hem oxigenasa y, por lo tanto, es exportado de la célula de forma intacta y puede ser determinado por fluorescencia. Células Caco-2 FLVCR-RNAi y controles fueron cargadas por el lado apical por 30 min con ZnPP 50  $\mu$ M. Luego, las células fueron dejadas en buffer de transporte y se determinó la salida de ZnPP de las células midiendo la disminución de la fluorescencia intracelular. Como muestra la Figura 18A, luego de la carga de 30 min, las células FLVCR-RNAi mostraron un contenido interno menor de ZnPP en comparación con las células control (0 min), debido posiblemente a

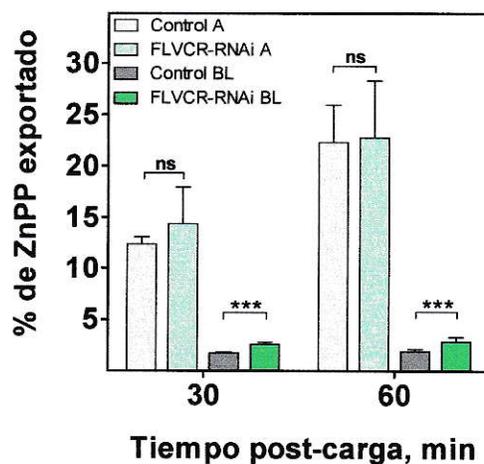
que la menor expresión de HCP1 en estas células resulta en una menor captación de ZnPP (ver resultados 3.8, arriba). Para ambas células se observó una disminución de la concentración de ZnPP intracelular en el tiempo luego de la carga (Figura 18A).



**Figura 18. Salida de ZnPP de células Caco-2 FLVCR-RNAi.** Células FLVCR-RNAi y controles fueron cargadas por 30 min con ZnPP 50  $\mu$ M y luego se determinó (A) la disminución de su concentración intracelular (Promedio  $\pm$  DE. n=3. ANCOVA: \*  $p < 0,05$ ) y (B) la aparición en los compartimientos apical (A) y basolateral (BL) luego de 30 y 60 min post-carga (Promedio  $\pm$  DE. n=3; t-Student: \*\*\*  $p < 0,001$ )

Se determinó además, la cantidad de ZnPP que fue exportada hacia cada compartimiento. En la Figura 18B es posible observar que tanto para las células controles como para las células FLVCR-RNAi la salida de ZnPP a través de la membrana apical fue mucho mayor que la salida a través de la membrana basolateral. Dado que el contenido inicial de ZnPP fue distinto, se calculó el porcentaje de salida de ZnPP con respecto a la cantidad interna de ZnPP luego de los 30 min de carga, para

poder comparar ambas células. Sorprendentemente, las células FLVCR-RNAi presentaron una mayor salida de ZnPP a través de la membrana basolateral que las células controles, mientras que la salida a través de la membrana apical no presentó diferencias (Figura 19).



**Figura 19. Porcentaje de ZnPP exportada hacia el compartimientos apical y basolateral.** Células FLVCR-RNAi y controles fueron cargadas por 30 min con ZnPP 50  $\mu$ M. A los 30 y 60 min post-carga se determinó la cantidad de ZnPP exportada hacia los compartimientos apical (A) y basolateral (BL) mediante fluorescencia. El porcentaje de ZnPP exportado fue calculado en relación a la cantidad intracelular de ZnPP luego de los 30 min de carga (Promedio  $\pm$  DE. n=3; t-Student: \*\*\* p<0,001).

#### 4. DISCUSIÓN

A pesar de que el hem dietario es la principal fuente de Fe para personas consumidoras de carnes rojas, los estudios de la absorción de Fe han estado centrados principalmente en el mecanismo por el cual el Fe no-hemínico es captado por las células intestinales, el cual se sabe, difiere de la vía de captación de hem. Debido a ello, hasta hace un tiempo atrás poco se conocía acerca del mecanismo involucrado en la absorción intestinal de hem, y varias hipótesis han sido planteadas intentando explicar cómo la molécula era transportada desde el lumen al interior de las células enterocíticas. El primer modelo propuesto involucra un receptor que media la endocitosis del hem (Gräsbeck y col., 1979), pero dicho receptor nunca ha sido identificado en células intestinales humanas. Varios estudios posteriores indican que el transporte de hem es mediado por un transportador (Worthington y col., 2001; Uc y col., 2004; Arredondo y col., 2008), siendo el único hasta ahora descrito HCP1 (Shayeghi y col., 2005). El modelo de absorción intestinal de hem aceptado actualmente (Oates y West, 2006) propone que la captación ocurre a través de un transportador, como HCP1, y/o por un proceso endocítico.

La degradación de hem y la liberación de Fe, es llevada a cabo por la enzima microsomal hem oxigenasa (HO) y la fracción no degradada es transportada desde las células enterocíticas a través de un exportador, como FLVCR, localizado en la membrana basolateral o apical. Existen, sin embargo, aún dudas sobre la real participación de HCP1 en el proceso de absorción intestinal, y hasta la fecha no existen estudios que vinculen a FLVCR con la exportación de hem en células enterocíticas.

En la presente tesis se utilizó la línea celular modelo de epitelio intestinal Caco-2 para estudiar el rol de HCP1 y FLVCR en la captación y transporte de Fe, mediante la técnica de RNA de interferencia, que permite lograr el silenciamiento de la expresión de estos genes. Además, se estudió su respuesta a nivel transcripcional frente a un estímulo de hem. Finalmente, se estudió si existe paso de hem intacto desde la membrana apical a la basolateral.

#### **4.1 Expresión de mRNA de HCP1 y FLVCR en respuesta a hem.**

Dado que las proteínas involucradas en el metabolismo intestinal de Fe presentan algún tipo de regulación, ya sea transcripcional, post-transcripcional o post-traducciona, que permite mantener los niveles adecuados de Fe corporal, es altamente probable que las proteínas que participan en la absorción de hem también estén sometidas a regulación. Por esta razón, estudiamos la respuesta a nivel transcripcional de HCP1 y FLVCR frente a estímulos de hem mediante RT-PCR cuantitativo.

Gran parte de los estudios relativos al estudio del metabolismo de hem utilizan hemina como fuente de hem. Sin embargo, el uso de hemina presenta dificultades debido a su insolubilidad y la formación de agregados. Además, la absorción es más eficiente cuando el hem se encuentra en presencia de péptidos de globina que cuando está solo (Follett y col., 2002; Arredondo y col. 2008). Para ofrecer estímulos de hem a las células se utilizó como fuente de hem un digerido parcial de hemoglobina, el cual se asemeja más a la condición fisiológica de absorción a la que están sometidas las

células intestinales. El hem presente en el digerido es absorbido por las células Caco-2, como indica el aumento de Fe intracelular (Figura 1A, Figura 4A).

Se ha demostrado (Cable y col., 1993) que la molécula de hem es capaz de regular su propio catabolismo en la célula al modular la expresión de HO-1, mediante la unión al represor transcripcional Bach1. El hem regula negativamente la actividad represora de Bach1, y permite que la proteína Nrf2 active la expresión de HO-1 (Ogawa y col., 2001; Sun y col., 2002). En células Caco-2, ya ha sido descrita la inducción de la hem oxigenasa por hem, la cual es dosis y tiempo dependiente (Cable y col., 1993; Uc y Britigan, 2003). Los resultados obtenidos mostraron una máxima inducción de la expresión de mRNA de HO-1 a las 12 horas de estímulo con hem (Figura 2A), lo que se correlaciona con un aumento de la concentración intracelular de hem pero no con la de Fe total. También se observó en este trabajo un aumento de los niveles relativos de mRNA de HO-1 cuando las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de hem extracelular por 12 horas (Figura 5A), resultados concordantes con los previamente publicados. El aumento en los niveles de mRNA se correlacionaron además, con un incremento en la actividad de HO (Figuras 2B y 5B) y resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que lo mismo ocurre con los niveles de proteína (Mendiburo, 2006). La inducción de la expresión de HO-1 es específica para hem, dado que un estímulo con Fe no-hemínico por 12 horas, no es capaz de elevar los niveles intracelulares de hem y no provoca una respuesta significativa en la expresión de HO-1 (Figuras 7 y 8A).

Estudios sobre la expresión de HCP1 en ratón habían mostrado que esta proteína no es regulada por cambios en los niveles corporales de Fe, como ocurre con

proteínas propias de la ruta de absorción de Fe no-hemínico (Shayeghi y col., 2005). En células Caco-2, la quelación de Fe intracelular no afecta la expresión de HCP1 (Latunde-Dada y col., 2006b). Nuestros resultados muestran que al recibir un estímulo extracelular de hem, las células disminuyen la expresión del mRNA de HCP1 (Figuras 2A y 6A) cuando las células alcanzan el máximo contenido de hem intracelular y por consiguiente, la máxima inducción de HO-1. Utilizando un estímulo de Fe no-hemínico no se encontraron variaciones en la expresión de HCP1 (Figura 8B), concordante con los resultados de Latunde-Dada y col. (2006b).

El patrón de expresión del mRNA de FLVCR frente a estímulos con hem fue similar al encontrado para HCP1. La disminución de su expresión en el tiempo fue sin embargo, constante (Figura 3B). Con respecto a la concentración extracelular, para un estímulo de 12 hrs la disminución de la expresión se presentó para hem extracelular 20  $\mu\text{M}$ , mientras que para concentraciones de 50 y 80  $\mu\text{M}$  sus niveles de mRNA no presentan diferencias con respecto a la condición basal (Figura 6B).

Sin embargo, estos resultados sólo nos indican que existe una variación en los niveles de mensajero, pero no podemos asegurar que estos cambios se reflejan de la misma manera en la abundancia de las proteínas HCP1 y FLVCR, ya que no existe necesariamente una correlación directa entre los niveles de mRNA y de proteína. Es entonces necesario complementar estos resultados con el uso de anticuerpos contra HCP1 y FLVCR para determinar si las respuestas observadas a nivel de mensajero se corresponden con los niveles de proteína.

## 4.2 Transporte transepitelial de hem en células Caco-2.

La succinilacetona es un potente inhibidor específico de la  $\delta$ -aminolevulinato (ALA) dehidratasa, la segunda enzima de la vía de síntesis de hem. Una concentración de 1 mM SA inhibe la síntesis de hem cerca de un 100% a las 12 horas de incubación (Beru y col., 1983; Ye y Zhang, 2004). Los experimentos realizados con SA, muestran que las células Caco-2 sintetizan activamente hem (Figura 9). Parte del hem sintetizado endógenamente es transportado a través de la membrana basolateral, y este transporte disminuye al caer la concentración de hem intracelular (Figura 10A).

Al incubar las células control con hem apical, hay un aumento del transporte a través de la membrana basolateral, como es esperado. El tratamiento con SA por 48 horas, si bien disminuye el transporte transepitelial de hem, no lo suprime. Hay que tener en cuenta que las células tratadas con SA deben presentar niveles basales de HO-1 menores a las células controles, dado que su concentración de hem intracelular disminuye, y por lo tanto una menor cantidad del hem captado es degradado en estas células. A pesar de esto, ya que la incubación con hem apical se realizó por 6 horas, la mayor degradación del hem captado es realizada por la HO-2, de expresión constante. De todas formas, estos resultados muestran que el hem captado es capaz de sufrir una transcitosis desde la membrana apical a la basolateral.

### **4.3 Rol de HCP1 en la captación de hem.**

Utilizando el sistema de vectores SureSilencing shRNA se obtuvo una línea estable de células Caco-2 que presentaba una inhibición de la expresión del mRNA de HCP1 cercana al 42 %. Este porcentaje de inhibición fue menor al esperado para estos vectores, de sobre un 70 %. Es posible que una alta inhibición de la expresión de HCP1 sea deletérea para las células.

Según los resultados obtenidos, la inhibición de la expresión de HCP1 no afecta el metabolismo intracelular de Fe, por lo menos no en lo que se refiere a contenido de Fe intracelular, ya que las células HCP1-RNAi no presentaron cambios en la concentración interna de Fe en comparación a las células controles. El contenido interno de hem, por su parte, mostró inesperadamente un ligero aumento, pero éste no fue estadísticamente significativo (Figura 12). Dado que las células fueron mantenidas en medio basal, con una baja concentración de hem extracelular, el hem presente en ellas proviene principalmente de la biosíntesis endógena, por lo que la disminución de HCP1 no estaría afectando la tasa de síntesis de hem.

Sin embargo, la expresión del mRNA de HO-1 en las células HCP1-RNAi fue significativamente menor que en las células control (Figura 13). La expresión de HO-1 está fuertemente controlada por los niveles intracelulares de hem a través de la competencia entre Bach1 y Nrf2 por la unión al promotor de HO-1, por lo que, al estar la expresión de HO-1 disminuida en las células HCP1-RNAi, debe existir una menor concentración de hem disponible para actuar sobre Bach1 y permitir la activación de la transcripción por parte de Nrf2 en estas células. Una posible explicación para este

resultado, ya que la concentración total de hem interno no varía con respecto a las células control, es que HCP1 participe en el tráfico intracelular de hem, y al disminuir su expresión quede parte del hem secuestrado en algún compartimiento celular, sin poder llegar al núcleo y ejercer su acción inductora. La expresión del mRNA de FLVCR, en cambio, no sufrió modificaciones producto de la disminución de HCP1.

Las células HCP1-RNAi mostraron una disminución en la captación de <sup>55</sup>Fe-hem (Figura 14), consistente con la hipótesis de que HCP1 es el transportador o uno de los transportadores que participa en la absorción de hem a nivel apical. El trabajo de Latunde-Dada y col. (2006b) realizado en células Caco-2, mostró el efecto de la sobreexpresión de HCP1 en la captación de hem, la cual aumenta aunque de manera moderada, posiblemente debido a la alta expresión endógena y a la existencia de regulación a nivel post-traducciona.

Trabajos realizados previamente en nuestro laboratorio sugieren la contribución de un proceso endocítico en la captación de hem por parte de células Caco-2 (Flores, 2006; Arredondo y col. 2008). Se ha observado una disminución en la captación de hem al someter a las células Caco-2 a la técnica de depleción de potasio intracelular (Larkin y col., 1983), la cual inhibe la endocitosis mediada por receptor al disminuir las vesículas recubiertas de clatrina en la membrana. La acidificación del citosol, que provoca una disminución de la formación de vesículas al disminuir el pH interno (Sandvig, 1987), también disminuye la captación de hem. Sin embargo, ambas técnicas son agresivas para las células y pueden tener efectos a nivel de síntesis y estructura de proteínas.

En este trabajo, se utilizó colchicina para determinar su posible efecto en la captación de hem (Figura 15). La colchicina induce la disrupción de microtúbulos, los cuales juegan un importante papel en el tráfico vesicular, tanto endocítico como de destinamiento de proteínas entre compartimentos celulares. El tratamiento con colchicina no tuvo efectos significativos en la captación de hem, ni para células controles ni para células HCP1-RNAi, si bien existió una pequeña disminución en ambos casos. Por lo tanto, si bien es probable que procesos endocíticos contribuyan a la entrada de hem a las células, no es el principal proceso involucrado y su bloqueo puede ser sobrellevado por la actividad de HCP1.

Estos resultados, junto con el hecho de la expresión del mRNA de HCP1 disminuye al aumentar la concentración de hem intracelular indicarían que existe una regulación transcripcional por la cual se impide un exceso de captación de hem cuando las células ya están saturadas.

#### **4.4 Papel de FLVCR en la salida de hem.**

El mismo sistema de vectores SureSilencing shRNA utilizado para la obtención de células HCP1-RNAi permitió contar con una línea estable de células Caco-2 que presentaba inhibición de la expresión del mRNA de FLVCR. En este caso, el porcentaje de inhibición fue mayor, cercano al 60 %.

Al igual que lo observado para las células HCP1-RNAi, la inhibición de FLVCR no tuvo efectos en el contenido de Fe intracelular ni en el contenido interno de hem

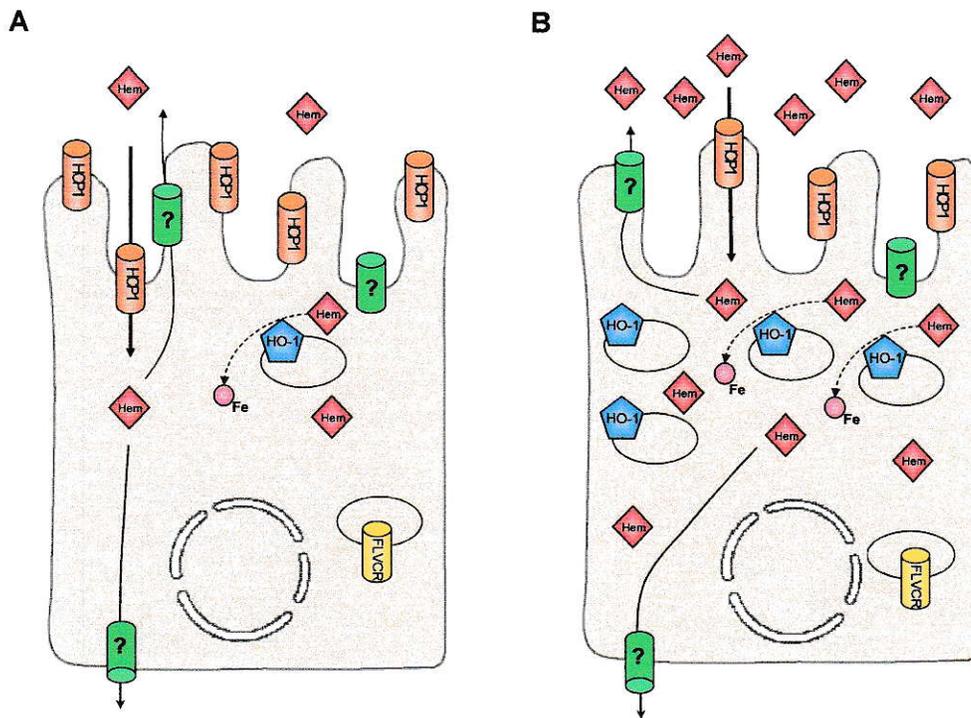
(Figura 16). La expresión del mRNA de HO-1 presentó un comportamiento inverso a lo encontrado para las células HCP1-RNAi, su expresión se indujo en las células FLVCR-RNAi, mientras que la expresión del mRNA de HCP1 se vio disminuida (Figura 17). Si la inhibición de la expresión de FLVCR es responsable de un aumento en la concentración de hem libre, la inducción de HO-1 podría compensar este efecto, aumentando el catabolismo de hem y manteniendo así constante su concentración intracelular, al igual que la disminución de HCP1, impidiendo que más hem sea captado.

Para determinar el rol de FLVCR en la salida de hem de las células Caco-2 se utilizó el análogo estructural ZnPP (cinc protoporfirina), debido a que no es degradado por la hem oxigenasa y permite eliminar la interferencia de la metabolización del hem. Varios análogos estructurales no metabolizables, como ZnPP, ZnMP (cinc mesoporfirina) y SnPP (protoporfirina de estaño) han sido utilizados en diferentes trabajos para estudiar el transporte de hem (Worthington y col., 2001; Quigley y col., 2004). Además, Shayeghi y col. (2006) mostraron que la ZnPP compite con el hem por la entrada a través de HCP1.

La inhibición de la expresión de FLVCR mostró un efecto inverso al esperado, aumentó la salida de ZnPP de las células a través de la membrana basolateral (Figura 19). Tanto en las células controles como en las células FLVCR-RNAi, la salida de ZnPP fue superior a través de la membrana apical, y este transporte no se vio afectada por la inhibición de la expresión de FLVCR. Uc y col. (2004) ya habían reportaron que en células Caco-2 existe un transporte de hem tanto en la vía absorptiva, de apical a basolateral, como secretoria, de basolateral a apical. Ellos encontraron que el

transporte de hem ocurre mayoritariamente por la vía secretoria. Se ha postulado que la secreción de hem por parte de células epiteliales intestinales podría ser parte de un mecanismo regulatorio de la absorción de hem, que impide una entrada excesiva de Fe al organismo. Sin embargo, parece ser que FLVCR no está directamente involucrado en la salida de hem de las células Caco-2, pero, según los resultados de un aumento de la expresión de HO-1, disminución de la expresión de HCP1 y el aumento de salida de ZnPP a través de la membrana basolateral en células FLVCR-RNAi, indica que FLVCR participaría en algún proceso de transporte de hem en estas células. Es poco probable que FLVCR pueda estar participando en la captación de hem, dado que se ha observado que media el transporte unidireccional de hem en células eritroides, y a pesar de someter a las células a deficiencia de Fe, FLVCR no revierte su función para aumentar la captación de hem (Quigley y col., 2004).

En la Figura 20 se muestra el modelo propuesto para la absorción intestinal de hem en base a los resultados obtenidos y al conocimiento sobre el tema.



**Figura 20. Modelo propuesto para la absorción intestinal de hem.** (A) El Fe hemínico es captado por la célula intestinal a través del transportador HCP1, ubicado en la membrana apical. Una vez en el interior de la célula, el hem puede ser convertido a biliverdina, CO y Fe(II) libre por la enzima microsomal HO o transportarse intacto hacia la circulación o el lumen intestinal a través de un exportador (cilindro verde). (B) Al aumentar el nivel intracelular de hem se regula negativamente la expresión de HCP1 y se induce la expresión de HO-1, lo cual hace que disminuya la captación y más hem se degrade, retornando a los niveles basales. FLVCR podría cumplir un rol en el tráfico intracelular de hem o en la salida de hem de algún organelo.

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que:

- 1) La proteína transportadora HCP1 participa en la captación de hem en el modelo celular Caco-2 y por tanto, es probable que también sea responsable de su captación a nivel intestinal.
- 2) En estas células modelo, existe una regulación negativa de la expresión del mRNA de HCP1 cuando los niveles intracelulares de hem aumentan, sugiriendo un mecanismo de protección de la célula que evita un exceso de absorción de hem.
- 3) El exportador de hem en células eritroides, FLVCR, no está directamente relacionado con el transporte de hem hacia el exterior en células Caco-2, pero podría cumplir una función en el metabolismo intracelular de hem.
- 4) La expresión del mRNA de FLVCR sufre, al igual que la de HCP1, una regulación negativa en presencia de hem, lo cual también apunta a que FLVCR está vinculado con el metabolismo de hem en estas células.
- 5) El hem captado a nivel de membrana apical es capaz de ser transportado de manera intacta hasta la membrana basolateral y ser exportado a través de ella.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abboud S y Haile DJ. **2000**. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J. Biol. Chem.* 275: 19906–19912.

Aisen P, Enns C y Wessling-Resnick M. **2001**. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 33: 940–59.

Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM y Cook JL. **1999**. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.* 274: 26071–26078.

Alvarez-Hernández X, Nichols G y Glass J. **1991**. Caco-2 cell line: a system for studying intestinal iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1070: 205–208.

Anderson GJ, Frazer DM, McKie AT, Vulpe CD y Smith A. **2005**. Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: lessons from inherited disorders of iron metabolism. *Biometals* 18: 339–348.

Andrews NC. **2000**. Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 01: 75–98.

Andrews NC. **2005**. Understanding heme transport. *N. Engl. J. Med.* 353: 2508–2509.

Arredondo M, Muñoz P, Mura CV y Núñez MT. **2003**. DMT1, a physiologically relevant apical Cu<sup>1+</sup> transporter of intestinal cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 284: 1525–1530.

Arredondo M, Kloosterman J, Núñez S, Segovia F, Candia V, Flores S, Le Blanc S, Olivares M y Pizarro F. **2008**. Heme Iron Uptake by Caco-2 Cells is a Saturable,

Temperature Sensitive and Modulated by Extracellular pH and Potassium. *Biol. Trace Elem. Res.* Epub ahead of print. 10.1007/s12011-008-8161-4

Beru N, Sahr K y Goldwasser E. **1983**. Inhibition of heme synthesis in bone marrow cells by succinylacetone: effect on globin synthesis. *J. Cell. Biochem.* 21: 93–105.

Burke W, Imperatore G y Reyes M. **2001**. Iron deficiency and iron overload: effects of diet and genes. *Proc. Nutr. Soc.* 60: 73–80.

Cable JW, Cable EE y Bonkovsky HL. **1993**. Induction of heme oxygenase in intestinal epithelial cells: Studies in Caco-2 cell cultures. *Mol. Cell. Biochem.* 129: 93–98.

Chomczynski P y Sacchi N. **1987**. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156–159.

Chung J y Wessling-Resnick M. **2003**. Molecular mechanisms and regulation of iron transport. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 40: 151–182.

Conrad ME, Weintraub LR, Sears DA y Crosby WH. **1966**. Absorption of hemoglobin iron. *Am. J. Physiol.* 211: 1123–1130.

Crichton RR y Charloteaux-Wauters M. **1987**. Iron transport and storage. *Eur. J. Biochem.* 164: 485–506.

Darshan D y Anderson GJ. **2007**. Liver-gut axis in the regulation of iron homeostasis. *World J. Gastroenterol.* 13: 4737–4745.

Denic S y Agarwal MM. **2007**. Nutritional iron deficiency: an evolutionary perspective. *Nutrition* 23: 603–614.

Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD,

Palis J, Fleming MD, Andrews NC y Zon LI. **2000**. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403: 776–781.

Ebert PS, Hess RA, Frykholm BC y Tschudy DP. **1979**. Succinylacetone, a potent inhibitor of heme biosynthesis: effect on cell growth, heme content and delta-aminolevulinic acid dehydratase activity of malignant murine erythroleukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88: 1382–1390.

Eisenstein RS. **2000**. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 627–662.

Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD y Andrews NC. **1998**. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 1148–1153.

Flores S. **2006**. Caracterización de la captación apical de hierro hemínico en células tipo epitelio intestinal. Memoria de Título. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Follett J.R., Suzuki Y.A. y Lonnerdal B. 2002. High specific activity heme-Fe and its application for studying heme-Fe metabolism in Caco-2 cell monolayers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**: G1125–G1131.

Fontecave M y Pierre JL. **1993**. Iron: metabolism, toxicity and therapy. *Biochimie* 75: 767–773.

Frazer DM y Anderson GJ. **2003**. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood Cells Mol. Dis.* 30: 288–297.

Galbraith RA, Sassa S y Kappas A. **1985**. Heme binding to murine erythroleukemia cells. Evidence for a heme receptor. *J. Biol. Chem.* 260: 12198–12202.

Garrick MD, Dolan KG, Horbinski C, Ghio AJ, Higgins D, Porubcin M, Moore EG, Hainsworth LN, Umbreit JN, Conrad ME, Feng L, Lis A, Roth JA, Singleton S y Garrick LM. **2003**. DMT1: a mammalian transporter for multiple metals. *Biometals* 16: 41–54.

Grasset E, Pinto M, Dussaulx E, Zweibaum A, Desjeux JF. **1984**. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *Am. J. Physiol.* 247: C260–267.

Gräsbeck R, Kouvonen I, Lundberg M y Tenhunen R. **1979**. An intestinal receptor for heme. *Scand. J. Haematol.* 23: 5–9.

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL y Hediger MA. **1997**. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388: 482–488.

Halleux C y Schneider YJ. **1994**. Iron absorption by CaCo 2 cells cultivated in serum-free medium as in vitro model of the human intestinal epithelial barrier. *J. Cell. Physiol.* 158: 17–28.

Hentze MW y Kühn LC. **1996**. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8175–8182.

Inoue K, Nakai Y, Ueda S, Kamigaso S, Ohta KY, Hatakeyama M, Hayashi Y, Otagiri M y Yuasa H. **2008**. Functional characterization of PCFT/HCP1 as the molecular entity of the carrier-mediated intestinal folate transport system in the rat model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294: G660–G668.

Jandl JH, Inman JK, Simmons RL y Allen DW. **1959**. Transfer of iron from serum iron-binding protein to human reticulocytes. *J. Clin. Invest.* 38: 161–85.

Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF y Koeffler HP. **1999**. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J. Biol. Chem.* 274: 20826–20832.

Krishnamurthy P, Xie T y Schuetz JD. **2007**. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol. Ther.* 114: 345–358.

Kumar S y Bandyopadhyay U. **2005**. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.* 157: 175–188.

Larkin J, Brown M y Goldstein J, Anderson R. **1983**. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 273–285.

Latunde-Dada GO, Simpson RJ y McKie AT. **2006a**. Recent advances in mammalian haem transport. *Trends Biochem. Sci.* 31: 182–188.

Latunde-Dada G, Takeuchi K, Simpson RJ y McKie A. **2006b**. Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. *FEBS Lett.* 580: 6865–6870.

Light WR y Olson JS. **1990**. Transmembrane movement of heme. *J. Biol. Chem.* 265: 15623–15633.

Lombard M, Chua E y O'Toole P. **1997**. Regulation of intestinal non-haem iron absorption. *Gut* 40: 435–439.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. **1951**. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.

Mackenzie EL, Iwasaki K y Tsuji Y. **2008**. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal.* 10: 997–1030.

Maines MD, Trakshel GM y Kutty RK. **1986**. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase: only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem.* 261: 411–419.

Maines MD. **1997**. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 517–554.

McCoubrey WK, Huang TJ y Maines MD. **1997**. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* 247: 725–732.

McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW y Simpson RJ. **2000**. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell* 5: 299–309.

McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneth F y Simpson RJ. **2001**. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291: 1755–1759.

Mena NP, Esparza A, Tapia V, Valdés P y Núñez MT. **2008**. Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294: G192–G198.

Mendiburo M.J. **2006**. Caracterización de la homeostasis de hierro en células Caco-2 expuestas a hierro hemínico y que sobreexpresan la enzima hemoxigenasa 1. Memoria de Título. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Morgan EH y Oates PS. **2002**. Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood Cells Mol. Dis.* 29: 384–399.

Nakai Y, Inoue K, Abe N, Hatakeyama M, Ohta KY, Otagiri M, Hayashi Y y Yuasa H. **2007**. Functional characterization of human proton-coupled folate transporter/heme carrier protein 1 heterologously expressed in mammalian cells as a folate transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322: 469–476.

Oates PS y West AR. **2006**. Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World J. Gastroenterol.* 12: 4281–4295.

Ogawa K, Sun J, Taketani S, Nakajima O, Nishitani C, Sassa S, Hayashi N, Yamamoto M, Shibahara S, Fujita H y Igarashi K. **2001**. Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J.* 20: 2835–2843.

Padmanaban G, Venkateswar V y Rangarajan PN. **1989**. Haem as a multifunctional regulator. *Trends Biochem. Sci.* 14: 492–496.

Parmley RT, Barton JC, Conrad ME, Austin RL y Holland RM. **1981**. Ultrastructural cytochemistry and radioautography of hemoglobin-iron absorption. *Exp. Mol. Pathol.* 34: 131–144.

Philpott CC. **2002**. Molecular aspects of iron absorption: Insights into the role of HFE in hemochromatosis. *Hepatology* 35: 993–1001.

Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH y Goldman ID. **2006**. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for Hereditary Folate Malabsorption. *Cell* 127: 917–928.

Quigley JG, Burns CC, Anderson MM, Lynch ED, Sabo KM, Overbaugh J y Abkowitz JL. **2000**. Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood.* 95: 1093–1099.

Quigley J, Yang Z, Worthington M, Phillips J, Sabo K, Sabath D, Berg C, Sassa S, Wood B y Abkowitz J. **2004**. Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* 118: 757–766.

Raffin S, Woo C, Roost K, Price D y Schmid R. **1974**. Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. *J. Clin. Invest.* 54: 1344–1352.

Sandvig K, Olsnes S, Petersen O y Van Deurs B. **1987**. Acidification of the cytosol inhibits endocytosis from coated pits. *J. Cell. Biol.* 679–689.

Schaer CA, Vallelian F, Imhof A, Schoedon G y Schaer DJ. **2008**. Heme carrier protein (HCP-1) spatially interacts with the CD163 hemoglobin uptake pathway and is a target of inflammatory macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 83: 325–333.

Sharma S, Dimasi D, Bröer S, Kumar R y Della NG. **2007**. Heme carrier protein 1 (HCP1) expression and functional analysis in the retina and retinal pigment epithelium. *Exp. Cell. Res.* 313: 1251–1259.

Sharp P y Srani SK. **2007**. Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J. Gastroenterol.* 13: 4716–24.

Shayeghi M, Latunde-Dada G, Oakhill J, Laftah A, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann F, Hider R, Frazer D, Anderson G, Vulpe C, Simpson R y McKie A. **2005**. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122: 789–801.

Shibahara S. **2003**. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *Tohoku J. Exp. Med.* 200: 167–186.

Siah CW, Ombiga J, Adams LA, Trinder D y Olynyk JK. **2006**. Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. *Clin. Biochem. Rev.* 27: 5–16.

Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H, Tashiro S, Takahashi S, Shibahara S, Alam J, Taketo MM, Yamamoto M y Igarashi K. **2002**. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J.* 21: 5216–5224.

Swanson CA. **2003**. Iron intake and regulation: implications for iron deficiency and iron overload. *Alcohol.* 30: 99–102.

Taylor CS, Willett BJ y Kabat D. **1999**. A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup C is a member of a transporter superfamily. *J. Virol.* 73: 6500–6505.

Tallkvist J, Bowlus CL y Lonnerdal B. **2000**. Functional and molecular responses of human intestinal Caco-2 cells to iron treatment. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 770–775.

Tenhunen R, Marver HS y Schmid R. **1968**. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 61: 748–755.

Tenhunen R, Marver HS y Schmid R. **1969**. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 244: 6388–6394.

Uc A y Britigan BE. **2003**. Does Heme Oxygenase 1 has a role in Caco-2 cell cycle progression? *Exp. Biol. Med.* 228: 590–595.

Uc A, Stokes J y Britigan B. **2004**. Heme transport exhibits polarity in Caco-2 cells: evidence for an active and membrane protein-mediated process. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 287: G1150–G1157.

Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J y Anderson GJ. **1999**. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nat. Genet.* 21: 195–199.

Wessling-Resnick M. **2000**. Iron transport. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 129–151.

Worthington M, Cohn S, Miller S, Qi Luo R y Berg C. **2001**. Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280: G1172–G1177.

Ye W y Zhang L. **2004**. Heme deficiency causes apoptosis but does not increase ROS generation in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 1065–1071.