

H-FC  
HG-BMCN  
629  
1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**DETERMINACIÓN DE LA RUTA DEGRADATIVA DE  
FERRITINA ENDOCITADA POR CÉLULAS CACO-2**

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

**ELMER RODRIGO ANTILEO IBARRA**

ENERO 2009

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO TULIO NUÑEZ



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE POSTGRADO

## INFORME DE APROBACIÓN

### TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y NEUROCIENCIAS

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato.

#### **ELMER RODRIGO ANTILEO IBARRA**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológica, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 24 de Septiembre de 2008.

**Director de Tesis**

Dr. Marco Tulio Núñez

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

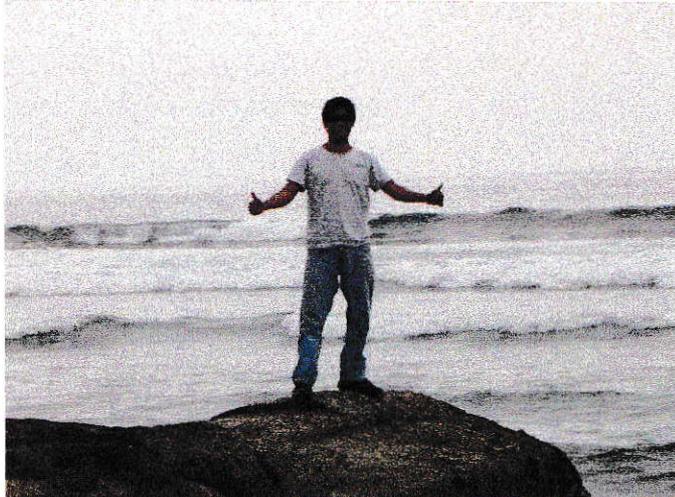
Dr. Miguel Arredondo

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Mauricio Gonzáles

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.





## **BIOGRAFÍA**

**Elmer Rodrigo Antileo Ibarra** nació el 28 de enero de 1981. Realizó sus estudios secundarios en el Liceo de Hombres A-59, Los Ángeles (VIII región), graduándose en el año 1998. Tras un breve paso por la Universidad Austral de Chile, se traslada a Santiago para continuar con sus estudios universitarios, ingresando a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile en el año 2000, obteniendo su título de Ingeniero en Biotecnología Molecular en el año 2008. Posteriormente realizó su Magíster en Ciencias Biológicas en el Programa de Biología Molecular, Celular y Neurociencias, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Su tesis de Magíster en Ciencias la realizó en el laboratorio de Biología del Envejecimiento (IBALab) y dirigida por el Dr. Marco Tulio Núñez. Continuará su carrera científica en el Leibniz-Institut für Neurobiologie (IFN), Magdeburg, Alemania, donde se incorporará al Programa de Doctorado en Neurobiología de dicho Instituto, bajo la tutela de Dr. Daniela Dieterich.

# FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT N° 1050068 y proyecto ICM P05-001-F al Instituto Milenio de Dinámica Celular y Biotecnología.



## AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos agradezco inmensamente por todo lo que me han entregado, por un lado el gran amor y la constante preocupación por mí, han permitido que ha medida que transcurre el tiempo mi amor por ellos y, por todo lo que me han dado, crezca día tras día. Por otro lado las enseñanzas y valores que he recibido de parte de ellos me han ayudado a ser persistente y obstinado en todas las metas que me planteo.

Quisiera agradecer cariñosamente al Dr. Marco Tulio Núñez (MTN), quien depositó en mí toda su confianza para realizar esta memoria de tesis, guiándome y enseñándome herramientas fundamentales para el análisis de maravillosos sistemas celulares, y que amablemente me entregó gran parte de los fundamentos necesarios para poder crecer y desarrollarme como un ente científico. Agradezco de igual manera a mis compañeros de labor, Vicky, Pancho, Dani, Alexis, Pabla, Ismael, Natalia, Enrique, Carolina G, Carolina C. y Pamela, con quienes compartí momentos muy agradables durante mi estadía en el laboratorio de biología del envejecimiento (IBAlab).

También no puedo desaprovechar la oportunidad de agradecer a mis amigos y “conocidos” por su compañía y fidelidad los momentos requeridos.

*En el fondo, los científicos somos gente con fortuna: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida....Lee Smolin. Físico Teórico.*



## INDICE DE MATERIAS



|  |     |
|--|-----|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....                        | vi  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....                   | vii |
| <b>RESUMEN</b> .....                                 | ix  |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                | xi  |
| <br>   |     |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....                         | 1   |
| 1.1 Antecedentes Bibliográficos.....                 | 1   |
| 1.2 Hipótesis de Trabajo. ....                       | 11  |
| 1.3 Objetivo General.....                            | 11  |
| 1.4 Objetivos Específicos. ....                      | 11  |
| <br>   |     |
| <b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                 | 12  |
| <b>2.1. Materiales</b> .....                         | 12  |
| 2.1.1. Anticuerpos.....                              | 12  |
| 2.1.2. Fluoróforos.....                              | 12  |
| 2.1.3. Proteínas.....                                | 12  |
| 2.1.4. Componentes del medio de cultivo celular..... | 12  |
| 2.1.5. Enzimas.....                                  | 13  |
| 2.1.6. Tampones Biológicos.....                      | 13  |
| 2.1.7. Equipos.....                                  | 13  |
| 2.1.8. Materiales de Cultivo.....                    | 13  |
| 2.1.9. Reactivos Generales.....                      | 14  |

|  |        |
|--|--------|
| <b>2.2. Métodos</b> .....  | 16     |
| 2.2.1 Cultivo Celular. ....  | 16     |
| 2.2.2. Condiciones de Cultivo.....   | 16     |
| 2.2.3. Subcultivo Celular.....   | 17     |
| 2.2.4. Recuento y Viabilidad Celular.....  | 17     |
| 2.2.5. Marcaje de HSFn con Alexa Fluor 488.....  | 18     |
| 2.2.6. Inmunolocalización de HSFn-488 en células Caco-2.....   | 18     |
| 2.2.7. Estudios de inmunolocalización de HSFn-488 y vesículas cubiertas<br>por clatrina.....                   | 19     |
| 2.2.8. Estudios de inmunolocalización de HSFn-488 y endosoma temprano.....                                     | 19     |
| 2.2.9. Estudios de inmunolocalización de HSFn-488 y autofagosomas.....   | 20     |
| 2.2.10. Estudios de inmunolocalización de HSFn-488 y lisosomas.....  | 20     |
| 2.2.11. Análisis de Imágenes adquiridas por Microscopia confocal.....  | 21     |
| 2.2.12. Microscopia Electrónica.....   | 22     |
| 2.2.13. Observación y Fotografiado en TEM.....   | 22     |
| <br><b>3. RESULTADOS</b> .....   | <br>23 |
| 3.1 Determinación de la presencia de ferritina exógena en vesículas endocíticas cubiertas<br>por clatrina..... | 23     |
| 3.2 Determinación de la presencia de ferritina exógena en endosoma temprano o de<br>sorting.....               | 30     |
| 3.3 Determinación de la presencia de ferritina exógena en compartimentos<br>autofágicos.....                   | 35     |
| 3.3.1 Condición de cultivo estándar .....  | 35     |
| 3.3.2 Condición de depleción de suero.....   | 38     |



|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.3 Condición de inhibición de la autofagocitosis.....                  | 40        |
| 3.3.4 Condición de inhibición de la actividad lisosomal... ..             | 42        |
| 3.4 Determinación de ferritina exógena en compartimentos lisosomales..... | 46        |
| <br>  |           |
| <b>4. DISCUSIÓN.....</b>  | <b>50</b> |
| <b>5. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>56</b> |
| <b>6. REFERENCIAS.....</b>  | <b>58</b> |

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Sobrevista de la vía endocítica ilustrando sitios de destinación entre rutas de tráfico.

**Figura 2:** Sistema autofágico.

**Figura 3:** Estructura de ferritina.

**Figura 4:** Inmunocolocalización de HSF<sub>n</sub>-488 con vesículas cubiertas por clatrina en células incubadas a 4 °C.

**Figura 5:** Inmunocolocalización de HSF<sub>n</sub>-488 con vesículas cubiertas por clatrina en células incubadas a 37 °C.

**Figura 6:** Microfotografía electrónica de ferritina exógena y una monocapa de células Caco-2.

**Figura 7:** Invaginación cubierta por clatrina.

**Figura 8:** Determinación de presencia de ferritina exógena en vesícula cubierta por clatrina.

**Figura 9:** Inmunocolocalización de HSF<sub>n</sub>-488 con endosomas tempranos.

**Figura 10:** Determinación de la presencia de ferritina exógena en endosomas del citoplasma periférico.

**Figura 11:** Inmunocolocalización de HSF<sub>n</sub>-488 con compartimentos autofágicos en células cultivadas bajo condiciones estándar.

**Figura 12:** Inmunocolocalización de HSF<sub>n</sub>-488 con compartimentos autofágicos en células cultivadas en condiciones de privación de nutrientes.

**Figura 13:** Inmunocolocalización de HSF<sub>n</sub>-488 con compartimentos autofágicos en células cultivadas bajo condición de inhibición de la autofagocitosis.

**Figura 14:** Inmunocolocalización de HSF<sub>n</sub>-488 con compartimentos autofágicos en células cultivadas bajo condición de inhibición de la actividad lisosomal.

**Figura 15:** Determinación de la presencia de ferritina exógena en putativos compartimentos autofágicos.

**Figura 16:** Inmunocolocalización de HSF $\alpha$ -488 con compartimentos lisosomales.

**Figura 17:** Determinación de la presencia de ferritina exógena en putativos compartimentos lisosomales.

**Figura 18:** Modelo propuesto para la endocitosis de ferritina exógena.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Composición de los medios de cultivo.

## ABREVIATURAS

|                   |   |
|-------------------|---|
| AP2               | : péptido de ensamblaje 2.                    |
| ARNm              | : ácido ribonucleico mensajero.               |
| BCA               | : ácido Bicinconínico.                        |
| BSA               | : albúmina sérica de bovino.                  |
| CaCl <sub>2</sub> | : cloruro de calcio.                          |
| Caco-2            | : línea celular de carcinoma de colon humano. |
| CO <sub>2</sub>   | : dióxido de carbono.                         |
| DMEM              | : medio esencial Dulbeco modificado.          |
| DMT1              | : transportador de metales divalentes.        |
| EDTA              | : ácido etilendiaminotetracético.             |
| EEA1              | : antígeno endosomal temprano 1.              |
| EEA               | : endosoma apical temprano.                   |

|                   |   |
|-------------------|---|
| FBS               | : suero fetal bovino.                                       |
| Fe                | : hierro.   |
| Fe no-hem         | : hierro inorgánico.  |
| Fe-hem            | : hierro hemínico.  |
| Fn                | : ferritina.  |
| Fn-H              | : ferritina de cadena pesada.                               |
| H <sub>2</sub> O  | : agua.   |
| HCl               | : ácido clorhídrico.  |
| HSFn              | : ferritina de bazo de caballo.                             |
| HSFn-488          | : ferritina de bazo de caballo marcada con Alexa Fluor 488. |
| IgG               | : inmunoglobulina G.  |
| IRE               | : elemento de respuesta a hierro.                           |
| Ireg1             | : ferroportina.   |
| IRP               | : proteína reguladora de hierro.                            |
| KCl               | : cloruro de potasio.                                       |
| kDa               | : kilo Dalton.  |
| LAMP1             | : proteína asociada a membrana lisosomal 1                  |
| LC3               | : cadena liviana 3.   |
| LIP               | : componente citosólico de hierro lábil.                    |
| MgCl <sub>2</sub> | : cloruro de magnesio.                                      |
| NaCl              | : cloruro de sodio.   |
| NaOH              | : hidróxido de sodio.                                       |
| ·OH               | : radical hidroxilo.  |
| PBS               | : solución tampón de fosfato salino.                        |
| rpm               | : revoluciones por minuto.                                  |
| RTf               | : receptor de transferrina.                                 |

SBFn : ferritina de poroto de soya.  
TEER : resistencia eléctrica trans epitelial.  
Tf : transferrina.

## RESUMEN

Las fuentes de hierro dietario conocidas son hierro hemínico (Fe-hem), presente principalmente en carnes animales, y hierro inorgánico, de origen vegetal o mineral. Sin embargo, existe una tercera fuente en la cual el hierro puede estar disponible, denominada ferritina. Ferritina es la principal proteína de almacenaje de hierro en células, con una capacidad para almacenar sobre 4.000 átomos de hierro por molécula, encontrada en componentes dietarios derivados tanto de origen animal como vegetal.

El objetivo de este estudio fue caracterizar la vía endocítica para ferritina exógena absorbida desde la membrana apical de células Caco-2, un modelo *in vitro* de epitelio intestinal humano. Evidenciamos que la endocitosis de ferritina se inició por su interacción con invaginaciones cubiertas por clatrina presentes en la membrana apical. Este hecho fue demostrado por análisis de co-localización entre ferritina y clatrina, determinado por microscopia confocal y ratificado por microscopia electrónica de transmisión. Adicionalmente, encontramos ferritina en compartimentos endosomales tempranos, determinado a través de co-localización de ferritina con el antígeno endosomal temprano 1 (EEA1), y en lisosomas, determinado por co-localización de ferritina con la proteína asociada a membrana lisosomal 1 (LAMP 1). Interesantemente, encontramos que ferritina colocaliza con LC3, una proteína marcadora de autofagosomas. En concordancia con este hallazgo, observaciones por microscopia electrónica revelaron la presencia de ferritina al interior de compartimentos multivesiculares de doble membrana similares a los descritos como autofagosomas.

Los resultados de esta tesis son consistentes con el modelo en el cual ferritina es internalizada desde lumen intestinal a través de invaginaciones cubierta por clatrina, prosiguiendo con una vía degradativa que involucra endosomas tempranos, autofagosomas y finalmente lisosomas, en donde ferritina es degradada y su hierro se hace disponible para el transporte a la circulación sanguínea.

## ABSTRACT

The known sources of dietary iron are hem iron, mostly present in animal meats, and inorganic iron, of mineral or vegetal origin. However, a third source form which iron could be available is ferritin, the main iron-storage protein in cells, with a capacity to store over 4,000 atoms of iron per molecule, found in dietary components from both animal and vegetal origin.

The aim of this study was to characterize the endocytic pathway for exogenous ferritin absorbed from the apical membrane of Caco-2 cells, an *in vitro* model of human intestinal epithelia. We found that ferritin endocytosis was initiated by its interaction with clathrin-coated pits present in the apical membrane, as ascertained by ferritin-clathrin co-localization determined both by fluorescence confocal microscopy and by transmission electron microscopy. We also found ferritin in early endosomal compartments, as determined by co-localization of ferritin with early endosomal antigen 1 and in lysosomes, as determined by ferritin-EEA1 and ferritin-LAMP 1 co-localization, respectively. Importantly, we found that ferritin co-localized with LC3, an autophagosome marker protein. In concordance with this finding, electron microscopy observations revealed the presence of ferritin inside double-membrane multivesicular compartments similar to those described as autophagosomes.

The findings of this thesis are consistent with a model in which ferritin is internalized from the intestinal lumen through clathrin-coated pits, and follows a degradative pathway that comprises early endosomes, autophagosomes and lysosomes, where ferritin is degraded and iron becomes available for transport to the blood circulation.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

#### **Absorción Intestinal del hierro.**

El hierro (Fe) es un elemento esencial que participa, formando parte de grupos prostéticos, en una gran variedad de enzimas y procesos celulares. Hay una variada gama de alimentos que son potenciales fuentes de Fe, pero a menudo su absorción se ve limitada por una baja biodisponibilidad (Clydesdale y cols., 1983). La biodisponibilidad del Fe es altamente dependiente de la forma química en que se encuentra y de la presencia de factores dietarios capaces de favorecer, o por el contrario, inhibir su absorción (McCance y cols., 1943; Disler y cols., 1975; Martínez-Torres y cols., 1981; Pizarro y cols., 1988).

En la actualidad se conocen dos vías plenamente caracterizadas por las cuales el Fe dietario es absorbido: la del Fe hemínico, proveniente de hemoglobina y mioglobina, liberado por enzimas pancreáticas en el lumen intestinal (Conrad y cols., 1967), y la del Fe no hemínico o Fe inorgánico. La absorción intestinal de Fe hemínico involucra tres pasos: (1) su captación apical desde el lumen del intestino, (2) su catabolismo dentro del enterocito y la liberación de su Fe y (3) la salida del Fe hacia la circulación (Oates y West, 2006). La absorción intestinal de Fe inorgánico consta de tres fases: (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). En el lumen intestinal el

$\text{Fe}^{+3}$  de la dieta es reducido a  $\text{Fe}^{+2}$  por la ferrireductasa citocromo b duodenal (Dcytb) presente en la membrana apical de los enterocitos (McKie y cols., 2001). Una vez reducido, el Fe es ingresado a la célula por el transportador de metales divalentes DMT1 (Gunshin y cols., 1997). El Fe que ingresa a los enterocitos se incorpora en ferritina (Fn), o es transportado hacia la circulación sanguínea por el transportador IREG1 (McKie y cols., 2001), también llamado Ferroportina1 (Donovan y cols., 2000). La solubilidad y biodisponibilidad de Fe inorgánico es influenciada grandemente por factores intraluminales externos e internos (Forth y Rummel, 1973).

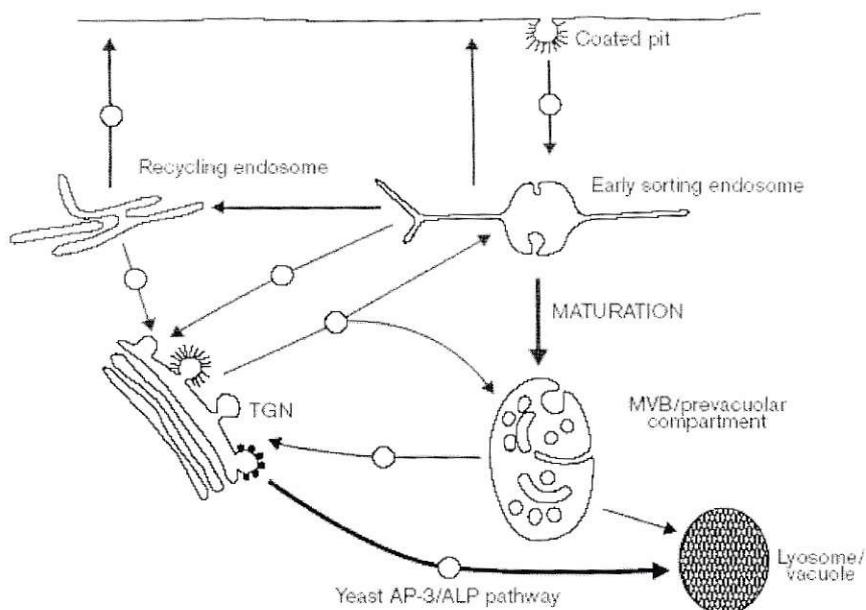
### **Endocitosis mediada por clatrina.**

La ruta y los compartimentos celulares causantes de la absorción y degradación de Fn por células del epitelio intestinal es poco conocida. Experimentos recientes en nuestro laboratorio indican que Fn entra a la célula del epitelio intestinal por endocitosis apical mediada por  $\mu 2$ , una subunidad de la adaptina AP2. Fn es posteriormente degradada y el Fe contenido en ella pasa a formar parte del componente citosólico de hierro lábil (LIP) (San Martín y cols., 2008).

La endocitosis es un proceso celular básico usado por las células para internalizar desde el medio externo una variedad de moléculas. Este proceso es parte de un dinámico y coordinado tráfico vesicular, el cual puede ser dividido en dos principales vías: transporte biosintético desde el retículo endoplásmico a través del complejo Golgi hacia la superficie celular, y la vía endocítica por la cual receptores de membrana plasmática,

nutrientes y moléculas de señalización son destinados hacia el sistema endosomal-lisosomal para reciclaje o degradación (Lemmon y Traub, 2000).

El sistema endosomal consiste en un conjunto de compartimentos vesiculares heterogéneos en su topología y composición. La vesícula endocítica formada en la membrana plasmática se fusiona inicialmente con el endosoma temprano o de seleccionamiento. La ruta por la que los receptores internalizados reciclan a la membrana plasmática comprende el paso desde el endosoma temprano al endosoma de reciclaje, en tanto que la ruta degradativa comprende el paso del endosoma temprano al endosoma tardío y los lisosomas (Figura 1). Adicionalmente, por microscopía electrónica es común observar un subconjunto de endosomas tardíos que presenta una apariencia multivesicular, por este motivo son denominados cuerpos multivesiculares (MVBs). Los endosomas tardíos y cuerpos multivesiculares forman una red dinámica junto con las estructuras lisosomales, siendo el punto final de la endocitosis y sitio de degradación de proteínas (Lemmon y Traub, 2000).



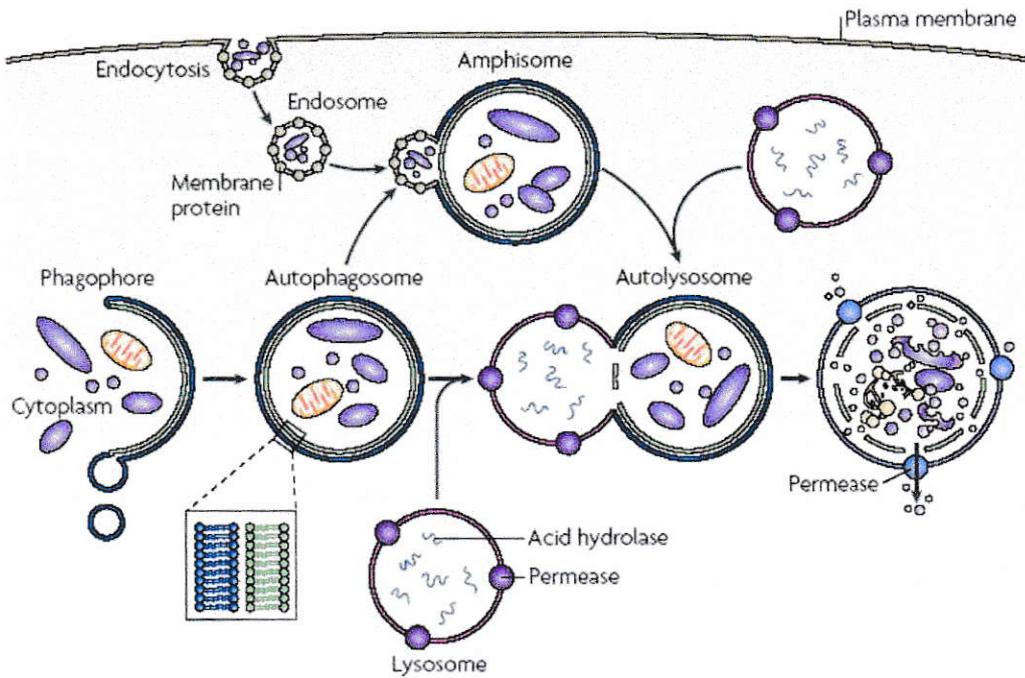
Lemmon and Traub. *Curr. Opin. Cell Biol.* (2000), 12: 457-466.

**Figura 1. Una sobrevista de la vía endocítica ilustrando sitios de destinación entre rutas de tráfico.** Proteínas exógenas y de transmembrana pueden ser internalizadas desde la membrana plasmática (PM) por endocitosis, la cual es mediada por clatrina. Las vesículas cubiertas por clatrina (CV) pierden su cubierta de clatrina después de la endocitosis y vesículas no-cubiertas subsecuentemente se fusionan a endosomas tempranos (EE). Desde esta región, cuerpos multivesiculares/endosomas tardíos (MVB/LE) son formados o maduran en lisosomas (LYSO), los cuales contienen una mezcla de diferentes proteasas. Proteínas dentro de endosomas tempranos pueden ser dirigidas hacia una ruta de reciclaje. Esto puede ocurrir directamente hacia la membrana o por una ruta lenta hacia la superficie celular vía endosomas de reciclaje (RE). Existe también un transporte bi-direccional entre endosomas de reciclaje y la red trans-Golgi, desde donde proteínas pueden ser enviadas hacia la superficie, así como a otros compartimentos incluyendo los endosomas tardíos.

## **Autofagia.**

La autofagia es un proceso celular por el cual la célula selecciona organelos, proteínas y cuerpos foráneos y los destina a los lisosomas para su degradación.

Los procesos autofágicos se sub-dividen en macroautofagia (MA) y microautofagia (MiA) (Reggiori y Klionsky, 2002; Wang y Klionsky, 2003). Ambas vías involucran una reorganización de membrana y, a diferencia de la degradación proteosomal, terminan en el sistema lisosoma/vacuola. La (MiA) involucra secuestro del citoplasma en la superficie del organelo que va a ser degradado por septación, y/o invaginación de su membrana. Por otro lado, la MA involucra el secuestro del citoplasma en una vesícula citosólica de doble membrana, denominada autofagosoma. Se postula que la formación del autofagosoma ocurre en una estructura pre-autofagosomal (PAS) (Suzuki y cols., 2001), (Noda y cols., 2002). Un primer paso hacia la formación del autofagosoma es la expansión de la membrana del pre-autofagosoma. Este paso depende de moléculas de señalización que modulan la actividad y expresión de algunos genes de la autofagia. En procesos heterofágicos de células animales, los autofagosomas pueden recibir material desde compartimentos endocíticos (Stromhaug y Seglen, 1993; Liou y cols., 1997) para formar un organelo híbrido denominado amfisoma (Figura 2) (Stromhaug y Seglen, 1993). Los autofagosomas completos se fusionan con el sistema lisosoma/vacuola, estructura degradativa denominada autolisosoma o autofago-lisosoma, y la membrana interna del autofagosoma es degradada en el lumen del lisosoma.



*Klionsky D. Nat. Mol. Cell Biol. Rev. 2007*

**Figura 2. Sistema autofágico.** El proceso de MA comienza con la formación de un fagoforo que se expande hacia un autofagosoma de doble membrana envolviendo una porción de citoplasma. El autofagosoma puede fusionar con un endosoma (el producto de la endocitosis), la cual es una forma de heterofagia (en un proceso heterofágico, la célula internaliza y degrada material que se origina fuera de la célula, en contraste a la autofagia, en la cual la célula consume parte de ella misma). El producto de la fusión endosoma–autofagosoma es conocido como amfisoma. El autofagosoma completado o amfisoma se fusionan con lisosoma, el cual suministra las hidrolasas ácidas. Las enzimas en el compartimiento resultante, un autolisosoma, rompen la membrana interna del autofagosoma y degradan el material contenido. Las macromoléculas son liberadas a través de permeasas y recicladas hacia el citosol.

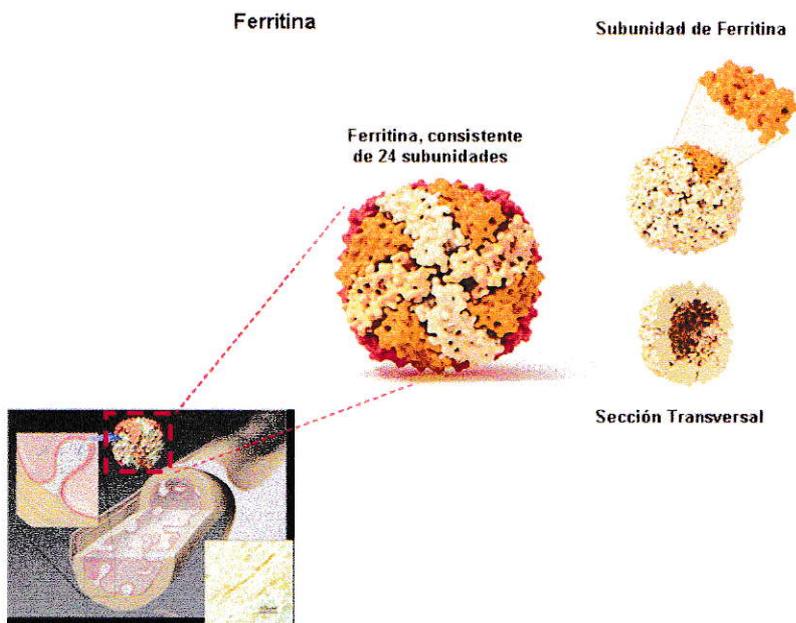
Otra forma de autofagia es la autofagia mediada por chaperonas (AMC), un proceso que degrada proteínas citosólicas que contienen un motivo consenso penta-peptídico (Majeski y Dice, 2004; Massey y cols., 2004). Los diversos tipos de autofagia se distinguen por su susceptibilidad a diferentes fármacos. Inhibidores de MA tales como 3-metiladenina, wortmanina, y LY294002 no tiene efectos sobre AMC. Degradación de proteínas por MA es sensible a inhibidores de microtúbulos tales como colcemida y vinblastina, pero la degradación de proteínas por AMC no es sensible a estos inhibidores. Activadores de MA tales como rapamicina no tiene efecto sobre AMC. Tanto la AMC, como MA, son inhibidas por inhibidores de la síntesis de proteína, tales como anisomicina y cycloheximida. AMC es también parcialmente inhibida cuando la proteína kinasa activada por mitogeno p38 es bloqueada. El inhibidor de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, 6-aminonicotinamida, y el inhibidor de la proteína de shock térmico de 90 kDa, geldanamicina, tienen la capacidad de activar AMC (Finn y cols., 2005).

La autofagia es un proceso indispensable para la sobrevivencia celular. La función de pro-sobrevivencia de la autofagia ha sido demostrada a nivel celular y a nivel de organismo, en diferentes contextos, incluyendo privación de nutrientes, factor de crecimiento, estrés de retículo endoplásmico, infección microbiana, y enfermedades caracterizadas por la acumulación de agregados proteicos (Yorimitsu y Klionsky, 2007; Levine y Yuan, 2005; Maiuri y cols., 2007).

## **Ferritina.**

En nuestra dieta hay una potencial tercera forma natural de Fe dietario: Fe en la forma de hidrato férrico insoluble recubierto por una capa proteica formada por múltiples subunidades globulares llamada ferritina (Fn). Estructuralmente, Fn es un heteropolímero formado por una combinación de 24 subunidades de cadenas peptídicas pesadas (H; 21 kDa) y livianas (L; 19 kDa), dando lugar a una estructura con un diámetro externo de 12-13 nm que exhibe una cavidad central de 7-8 nm capaz de almacenar más de 4.000 átomos de Fe como un núcleo de ferri-oxi-hidrato (Figura 3) (Harrison y Arisio, 1996; Theil, 2003).

La subunidad H juega un rol en el secuestro rápido de Fe, debido a que posee actividad ferroxidasa responsable de convertir Fe ferroso soluble en la forma férrica almacenable, mientras que la subunidad L facilita la nucleación, mineralización y almacenaje del Fe a largo plazo (Rucker y cols., 1996). La proporción de las subunidades H y L en la proteína varía en los diferentes tejidos, permitiendo una complementariedad de funciones en la proteína (Harrison y Arisio, 1996).



**Figura 3. Estructura de Ferritina.** Heteropolímero con sus 24 subunidades (H y L) ensamblados en una estructura capaz de almacenar en su interior Fe en la forma de cristales de ferri-oxi-hidrato, y con la capacidad de acumular hasta 4.500 átomos de Fe. Imágenes obtenidas de [www.electron.nci.nih.gov/html/research4.html](http://www.electron.nci.nih.gov/html/research4.html) y [www.ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/ferritin](http://www.ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/ferritin).

Fn es altamente conservada en la evolución (Theil, 1990), y las subunidades H y L de diversas especies tienen estructuras y funciones análogas (Rucker y cols., 1996). Su función de secuestro de Fe sugiere que Fn podría actuar como una proteína citoprotectora, minimizando la concentración de Fe redox-activo y la formación de radical hidroxilo mediada por la reacción de Fenton.

La Fn endógena es degradada en lisosomas mediante un proceso de autofagia (Hultcrantz y Glaumann, 1987; Kurz y cols., 2007) aunque recientemente se demostró que la apo-ferritina es degradada en proteasomas (De Domeico y cols., 2006). Un efecto beneficioso de la autofagia de Fn, relacionado a resistencia celular y lisosomal a estrés

oxidativo, es que Fn, antes de ser degradada, es capaz de mantener quelado su Fe intralisosomal (antes de ser liberado hacia el citosol), de esta manera reduce su concentración y por lo tanto la sensibilidad de lisosomas a estrés oxidativo (Garner y cols., 1997; 1998).

Fn es una fuente potencial de Fe dietario ya que es abundante en tejidos como hígado, corazón y páncreas y en las semillas de las leguminosas (Theil, 2004). La posibilidad de poder implementar el uso de alimentos ricos en Fn como fuente dietaria de Fe es atractiva debido a su condición de alimento natural (Lucca y cols., 2002). A la fecha, hay escasa pero significativa evidencia respecto al uso de Fn como fuente de Fe (Layrisse y cols., 1975; Lucca y cols., 2002; Murray-Kolb y cols., 2003). Sin embargo, se hacen necesarios estudios básicos para entender los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la posible absorción de Fe ferritínico.

En experimentos exploratorios de nuestro laboratorio, encontramos que Fn de poroto de soya (SBFn) previamente marcada con el fluoróforo Alexa 488 se encontró en compartimentos macroautofágicos, como se determinó por colocalización con el marcador LC3. Esta observación plantea una posible conexión entre el sistema endosomal y el sistema autofágico.

En esta tesis, utilizando células Caco-2 como modelo celular de epitelio intestinal, se abordó, mediante técnicas de microscopía electrónica y microscopía confocal, la caracterización de la ruta degradativa de Fn dietaria.

## **1.2 Hipótesis de trabajo.**

La asimilación de Fn dietaria por células del epitelio intestinal comprende su internalización desde invaginaciones cubiertas por clatrina y el paso por un compartimento autofágico previo a su degradación en los lisosomas y la liberación de su hierro al citoplasma celular.

## **1.3 Objetivo General.**

Caracterizar la ruta endocítico/degradativa de Fn en células Caco-2, un modelo de epitelio intestinal.

## **1.4 Objetivos Específicos.**

**Objetivo 1.** Determinar la presencia de Fn en vesículas endocíticas cubiertas por clatrina.

**Objetivo 2.** Determinar la presencia de Fn en el endosoma temprano.

**Objetivo 3.** Determinar la presencia de Fn en putativos compartimentos endosomales y autofágicos.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Materiales.**

#### **2.1.1 Anticuerpos.**

IgG de cabra anti-conejo conjugado a Alexa 488. Invitrogen-Molecular Probes (A-11008).

IgG de cabra anti-ratón conjugado a Alexa 546. Molecular Probes (A21124).

Anticuerpo monoclonal anti-early endosome antigen 1 (EEA1). BD Biosciences (610456).

Anticuerpo monoclonal anti-lisosomal associated membrane protein 1 (LAMP1). BD Biosciences (555798).

Anticuerpo monoclonal anti-clatrina. Calbiochem (CP45).

Anticuerpo monoclonal anti-Light Chain 3 (LC3). Santa Cruz (sc-28266).

#### **2.1.2 Fluoróforos.**

Alexa Fluor® 488 Protein Labelling Kit. Molecular Probes (A10235).

### **2.1.3 Proteínas.**

Se utilizó Fn de bazo de caballo (HSFn), con una relación Fe: Fn mol:mol de 2200:1. Sigma (F-4503).

Albúmina de suero de bovino (pH 7.0) Winkler (BM-0150).

### **2.1.4 Componentes del medio de cultivo celular.**

Medio esencial Dulbecco modificado (DMEM); tripsina; fungizona; antibióticos (penicilina-estreptomicina) y suero fetal bovino (FBS) de Gibco-BRL, Life Technologies (Gaithersburg, USA).

### **2.1.5 Enzimas.**

Tripsina de páncreas de bovino 1:250 (EC 3.4.21.4). Sigma (T-0646).

### **2.1.6 Tampones biológicos.**

PBS: 15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 81 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,4 M NaCl, 27 mM KCl, pH 7,4.

TBS: 0,14 M NaCl, 2,68 mM KCl, 25 mM Tris base, pH 8.

### **2.1.7 Equipos.**

Campana de Flujo laminar, Nuaire, UN-201-430.

Centrifuga Mikro 22R (Hettich, Tuttlingen, Germany).

EVOM Epithelial Volthommeter (World Precision Instruments).

Lector de microplacas Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc.).

Microscopio Confocal. Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany).

Microscopio Óptico Nikon TMS.

### 2.1.8 Material de Cultivo.

Botellas plásticas de 40 mL, área de crecimiento 25 cm<sup>2</sup>. Corning-Costar (3025).

Placas de cultivo 24 pocillos, 16 mm diámetro, Corning-Costar (3424).

Tubos de centrifugas plásticos 50 mL y 15 mL, Falcon.

Pipetas plásticas Corning-Costar, 10 mL (4101), 5 mL (4050).

Unidades de filtración, tamaño poro 0,2 µm Corning-Costar, 500 mL.

Placas de ELISA, Nunc Inc.

Insertos bicamerales Transwells-Clear, con membrana de poliéster, 6,5 mm de diámetro. Corning-Costar (3470).

Botellas de cultivo. Schott Duran, 500 mL.

Cubre objetos 12 mm de diámetro.

### 2.1.9 Reactivos Generales.

Acetato de uranilo (AcUr). Ted Pella (19481).

Acetona p. a. Merck (100014).

Ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Merck (1118011).

Ácido clorhídrico fumante 37 % p. a. Merck (100317).

Archilamida. Winkler (BM-0070).

Citrato de plomo. Eastman (11534).

Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O). Merck (160482).

Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>). Merck (105833).

Cloruro de Potasio (KCl). Merck (104636).

Cloruro de Sodio (NaCl). Merck (106404).

Dimetilsulfóxido (DMSO). Sigma (D-5879).

EIA Grade Reagent Gelatin. BIO-RAD (170-6537).

Etanol absoluto, p. a. Merck (1.00983).

Glicina. Winkler (BM-0820).

Glutaraldehído 25 %. Sigma (G-5882).

Hidróxido de Potasio (KOH). Merck (105021).

Hidróxido de Sodio (NaOH), p. a. Merck (106498).

Inhibidor de proteasas. Sigma (P8340).

L-glutamina. Sigma (G-3126).

LR-Gold. London Resin Company Ltd (14371).

Medio de Montaje acuoso con agente anti-fading. FluorSave Reagent Calbiochem (345789).

Metanol. TCL.

Paraformaldehído. Polysciences (0380).

Película de revelado de imagen. Electron image film. Kodak (SO-163).

Piruvato, sal de sodio. Sigma (P-2256).

Tris (Trizma). Winkler (BM-2000).

Triton X-100. Sigma (T-6878).

## **2.2 Métodos.**

### **2.2.1 Cultivos Celulares.**

Se usó la línea celular Caco-2 (American Culture Collection, #HTB37, Rockville, MD), derivada de carcinoma de colon humano (Fogh y cols., 1977), y semeja un modelo de epitelio intestinal (Arturson, 2001). La particularidad de estas células es crecer en monocapas altamente polarizadas y expresan GLUT-5, un marcador de microvellosidades de intestino delgado que no está presente en colon (Mahraoui y cols., 1992), presentan inhibición de la proliferación por contacto y forman uniones estrechas con una resistencia trans-epitelial aproximada de 240 ohm x cm<sup>2</sup>.

### **2.2.2 Condiciones de cultivo.**

El medio de cultivo utilizado es indicado en la tabla 1. Las células fueron sembradas a densidades variables (aprox. 7000 células/cm<sup>2</sup>), como se indica en cada caso y según el experimento realizado.

El medio de cultivo fue renovado cada 48 h previo lavado con PBS. Las células fueron cultivadas en un incubador a 37 °C, con atmósfera controlada conteniendo 5 % de CO<sub>2</sub>.

**Tabla 1.** Composición de los medios de cultivo.

| Tipo Celular | Medio Base | % y origen de Suero                | Otros suplementos   | Características generales de las células   |
|--------------|------------|------------------------------------|---|--|
| Caco-2       | D-MEM      | 10 % suero fetal bovino (SF) Gibco | Aminoácidos no esenciales (100 $\mu$ M),<br>Penicilina/Estreptomicina (10.000 UI/10.000 $\mu$ g)<br>Fungizona (25 $\mu$ g/mL) | Forma rectangular-exagonal, crecimiento en monocapas.<br>~20 $\mu$ m de diámetro |

Los cultivos celulares fueron realizados sobre filtros porosos en insertos bicamerales. Este un sistema ventajoso debido a que posee una geometría que permite acceder en forma independiente a los dominios apical y basolateral.

### 2.2.3 Subcultivo celular.

Células que alcanzaron niveles cercanos a confluencia se liberaron de la placa mediante un tratamiento por 7 min a 37 °C con una solución de tripsina-EDTA en PBS (0,5 % tripsina, 0,53 mM EDTA). El efecto de tripsina-EDTA se bloqueó por adición de dos volúmenes de medio de cultivo completo. Tras centrifugar a 500x g durante 10 min a temperatura ambiente, el sedimentado fue resuspendido en el medio correspondiente y las células se siembran a las densidades indicadas en cada caso. La confluencia celular fue determinada mediante observación visual de los cultivos celulares a través de microscopio óptico y para el caso de cultivos celulares sembrados en insertos bicamerales se determinó confluencia celular a través de la medición de su resistencia eléctrica transepitelial (TEER), la cual fue  $\geq 240$  ohm x cm<sup>2</sup>.

#### **2.2.4 Recuento y viabilidad celular.**

El número de células se determinó mediante recuento en hemocitómetro (cámara de Neubauer). Las células fueron teñidas con azul de tripán, lo que permitió reconocer células vivas (refringentes) de células muertas (teñidas de azul).

#### **2.2.5 Marcaje de HSFn con Alexa Fluor 488.**

Se procedió a unir HSFn con Alexa Fluor 488 (HSFn-488), utilizando Alexa Fluor® 488 Protein Labelling kit (Invitrogene-Molecular Probes) tomando en consideración las recomendaciones dispuestas en el protocolo indicado por el fabricante.

Posteriormente se procedió a medir absorbancia a 280 y 494 nm para determinar el grado de marcación (moles de marca/moles de proteína). Luego la proteína fue almacenada a 4 °C y en oscuridad.

### **2.2.6 Inmunolocalización de HSFn-488 en células Caco-2.**

Células Caco-2 crecidas a confluencia sobre insertos bicamerales fueron incubadas con 30 nM HSFn-488 por 20 min a 37 °C, lavadas con PBS, fijadas con 4 % paraformaldehído y lavadas 5 veces con PBS Ca/Mg. Las células fueron permeabilizadas con 0,5 % Tritón X-100 en PBS Ca/Mg por 10 min, seguido de 3 lavados con la misma solución y 3 lavados con PBS Ca/Mg. Luego las células fueron bloqueadas con 5 % BSA, 20 % SFB y 5 mM EDTA por 1 h. Incubaciones con anticuerpos primarios fueron realizadas por 1 h a temperatura ambiente, y posteriormente las células fueron lavadas con PBS e incubadas con anticuerpo secundario por 2 h a temperatura ambiente, luego son lavadas y montadas sobre porta objetos utilizando medio de montaje FluorSave Reagent (Calbiochem). Las muestras finalmente son analizadas mediante microscopia confocal.

### **2.2.7 Estudios de inmunolocalización de HSFn-488 y vesículas cubiertas por clatrina.**

A modo de poder determinar la presencia de HSFn-488 en vesículas cubiertas por clatrina se realizó inmunocitoquímica dirigida contra clatrina. Células Caco-2 crecidas a confluencia sobre insertos bicamerales fueron incubadas con 30 nM HSFn-488 por 20 min a 37 °C y 1 h a 4 °C. Posteriormente las células se lavaron con PBS, se fijaron con 4 % paraformaldehído, permeabilizadas con 0,5 % Tritón X-100 en PBS Ca/Mg por 10 min y bloqueadas con 5 % BSA, 20 % SFB y 5 mM EDTA por 1 h, seguido de incubación con anticuerpo monoclonal primario anti-clatrina (dilución 1:300). Las células fueron incubadas

con anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado a Alexa 546 (dilución 1:400) por 2 h a temperatura ambiente, montadas y analizadas mediante microscopia confocal (LSM 510 META, Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

### **2.2.8 Estudios de inmunolocalización de HSFn-488 y endosoma temprano.**

Con el propósito de poder determinar inmunocolocalización entre HSFn-488 y compartimentos endosomales tempranos se realizó inmunocitoquímica dirigida contra el marcador endosomal EEA1. Células fueron crecidas a confluencia sobre insertos bicamerales e incubadas con 30 nM HSFn-488 durante 20 min a 37 °C, lavadas con PBS, fijadas con 4 % paraformaldehído, permeabilizadas con 0,5 % Tritón X-100 en PBS Ca/Mg por 10 min y bloqueadas con 5 % BSA, 20 % SFB y 5 mM EDTA por 1 h, seguido de incubación con anticuerpo monoclonal primario anti-EEA1 (dilución 1:300). Luego las células fueron incubadas con anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado a Alexa 546 (dilución 1:400) por 2 h a temperatura ambiente, montadas y analizadas mediante microscopia confocal (LSM 510 META, Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

### 2.2.9 Estudios de inmunolocalización de HSFn-488 y autofagosomas.

Con la intención de poder determinar inmunocolocalización entre HSFn-488 y compartimentos autofágicos se realizó inmunocitoquímica dirigida contra el marcador de autofagosomas LC3. Cultivos celulares crecidos a confluencia sobre insertos bicamerales fueron incubados con 30 nM HSFn-488 por 20 min a 37 °C. Luego las células fueron lavadas con PBS, fijadas con 4 % paraformaldehído, permeabilizadas con 0,5 % Tritón X-100 en PBS Ca/Mg por 10 min y fueron bloqueadas con 5 % BSA, 20 % SFB y 5 mM EDTA por 1 h, con posterior incubación con anticuerpo monoclonal primario anti LC3 (dilución 1:300). Las células fueron incubadas con anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado a Alexa 546 (dilución 1:400) por 2 h a temperatura ambiente, montadas y analizadas mediante microscopia confocal (LSM 510 META, Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

### **2.2.10 Estudios de inmunolocalización de HSFn-488 y lisosomas.**

Con el fin de poder determinar inmunocolocalización entre HSFn-488 y compartimentos lisosomales se realizó inmunocitoquímica dirigida contra el marcador de membrana lisosomal LAMP1. Células crecidas a confluencia sobre insertos bicamerales fueron incubadas con 30 nM HSFn-488 durante 20 min a 37 °C. A continuación las células se lavaron con PBS, se fijaron con 4 % paraformaldehído, permeabilizadas con 0,5 % Tritón X-100 en PBS Ca/Mg por 10 min y fueron bloqueadas con 5 % BSA, 20 % SFB y 5 mM EDTA por 1 h, y posteriormente fueron incubadas con anticuerpo monoclonal primario anti LAMP1 (dilución 1:300). Luego las células fueron incubadas con anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón conjugado a Alexa 546 (dilución 1:400) por 2 h a temperatura ambiente, montadas y analizadas mediante microscopia confocal (LSM 510 META, Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

### **2.2.11 Análisis de Imágenes adquiridas por Microscopia confocal.**

Las imágenes adquiridas por microscopia confocal fueron sometidas a procesos de deconvolución de imágenes, mediante los cuales las imágenes son procesadas a nivel de sus intensidades de fluorescencia, eliminando parte de señales superpuestas (desenfoques) y ruidosas (propias del instrumento, sonda en estudio y ambiente) de fluorescencia, logrando obtener una imagen más representativa de la imagen real. Este proceso fue realizado a través de la utilización del programa Huygens 3.0 (dispuesto amablemente por el Dr. Stefen Härtel, Facultad de Medicina, Universidad de Chile). Las muestras fueron analizadas por microscopia confocal, realizando cortes ópticos en el eje Z de 0,3  $\mu\text{m}$  cada uno, con posterior deconvolución de cada corte óptico. Las imágenes mostradas en cada una de las figuras, corresponden a imágenes focales representativas para cada uno de las diferentes fluorescencias y condiciones analizadas.

Los análisis de perfiles de intensidades de fluorescencia fueron realizados con el programa LSM del microscopio confocal, realizando 4 análisis independientes de perfiles de intensidades de fluorescencia, sobre distintas zonas dentro de la imagen. Posteriormente se realizó la cuantificación de las intensidades de fluorescencias relativas para cada canal (rojo y verde), y finalmente los valores fueron normalizados. En cada una de las figuras se muestran imágenes representativas para cada uno de estos análisis de cuantificación de fluorescencia.

### **2.2.12 Microscopia Electrónica.**

Células Caco-2 crecidas sobre insertos bicamerales fueron incubadas con 30 nM HSFn a 37 °C por 30 min, lavadas por 30 min en medio DMEM y posteriormente fijadas con 50 % fijador Karnovsky por 30 min. Luego se post-fijaron con tetróxido de Osmio (O<sub>4</sub>Os) reducido al 1 %, seguido de una deshidratación con batería de alcoholes (etanol 30, 50,70 ,80 ,90 ,95 ,97 y 100 %). El alcohol residual fue retirado mediante suaves lavados con resina Epon 812 e inmediatamente las muestras fueron embebidas en esta misma resina, dejando polimerizar a 62 °C durante 48 h. Se realizaron cortes finos de las muestras de 60 nm aproximadamente, y a continuación fueron contrastados por 40 min en acetato de uranilo y en citrato de plomo por 3 min.

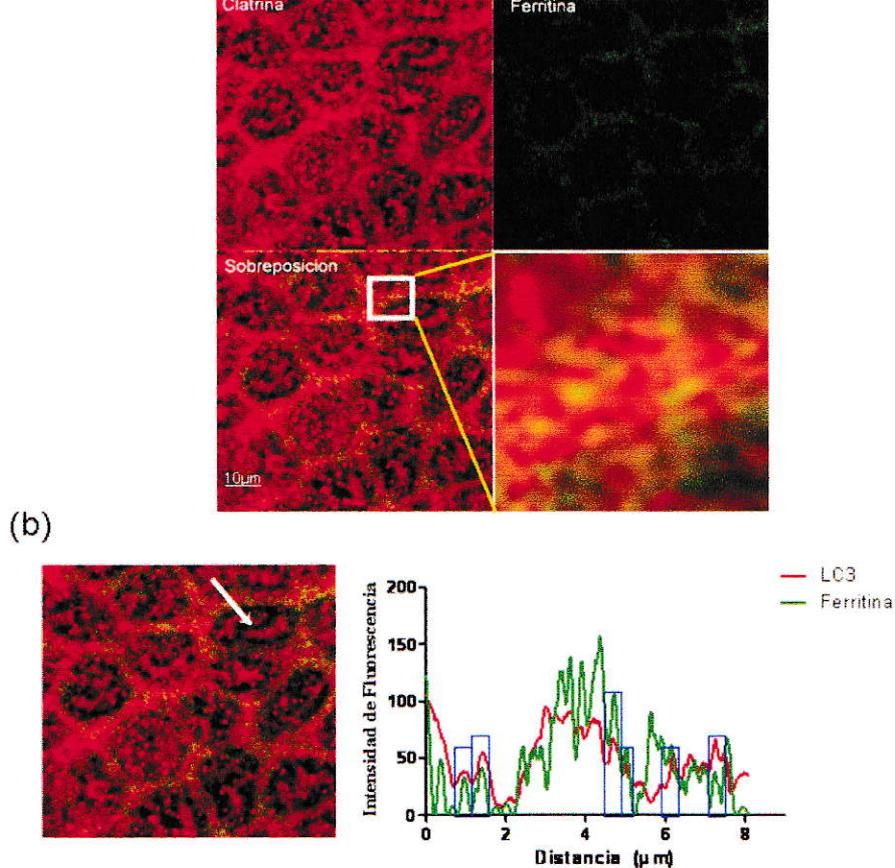
### **2.2.13 Observación y Fotografiado en TEM.**

Las muestras tratadas para MET fueron inspeccionadas en un Microscopio electrónico de transmisión JOEL, modelo JEM SX100, trabajando a 80 kV de aceleración. Las fotografías se obtuvieron a partir de películas de revelado expuestas en forma automática en el microscopio. Los negativos fueron revelados siguiendo procedimientos habituales para fotografía en blanco y negro.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Determinación de la presencia de ferritina exógena en vesículas endocíticas cubiertas por clatrina.

Con el propósito de evaluar si Fn exógena ingresa a la célula apicalmente a través de vesículas cubiertas por clatrina, se realizó inmunocitoquímica utilizando HSFn marcada con AlexaFluor 488 y anticuerpo anti-clatrina detectado con anti-IgG marcado con AlexaFluor 546. Las células se incubaron por el dominio apical con 30 nM HSFn-AlexaFluor 488 (HSFn-488) por 1 h a 4 °C, para permitir visualización de posibles compartimentos de colocación. Las muestras se analizaron mediante microscopia confocal, y las imágenes obtenidas fueron analizadas por medio de la función de cuantificación, utilizando el programa LSM del microscopio confocal, que permite determinar la existencia de correlación entre el patrón de intensidades relativas de las señales de fluorescencia en estudio. Con este análisis se pudo observar que, predominantemente en múltiples regiones membranosas, la señal de fluorescencia correspondiente a HSFn-488 se correlaciona con la presencia de la señal de clatrina. La incubación a 4 °C mostró posibles puntos de colocación en variadas zonas membranosas (Figura 4a). La ampliación en tamaño de una de estas zonas con posible colocación, permitió evaluar con mayor facilidad la existencia de píxeles de coloración amarilla, indicando que esa región posee fluorescencia roja y verde (Figura 4a, ampliación de zona delimitada). La figura 4b muestra la existencia de por lo menos 6 regiones (barras en azul), en donde las intensidades de fluorescencia son coincidentes para ambas señales de fluorescencia, una evidencia de su posible colocación, en donde se puede observar la presencia de intensidades de fluorescencia coincidentes para ambas señales (bajo la línea trazada sobre la imagen), distribuidas tanto en regiones membranosas como también en regiones cercanas a la membrana celular (Figura 4b).

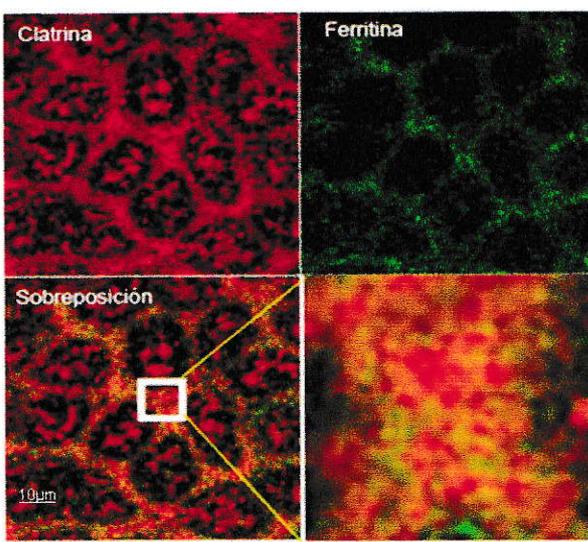


**Figura 4. Inmunocolocalización de HSFn-488 con vesículas cubiertas por clatrina en células incubadas a 4 °C.** Células Caco-2 se incubaron por el dominio apical con 30 nM HSFn-488 por 1 h a 4 °C. Posteriormente se fijaron y la presencia de clatrina se determinó con anticuerpo contra clatrina detectado con anti-IgG marcado con AlexaFluor 546. **(a)** Corte óptico del dominio apical mostrando fluorescencia de clatrina (rojo) y de HSFn-488 (verde). El panel inferior izquierdo muestra la sobreposición de las señales roja y verde. El panel inferior derecho muestra una ampliación del recuadro mostrado en la imagen de sobreposición. **(b)** Representación gráfica (recuadro derecho) de las intensidades relativas de fluorescencia (eje Y) de la señal verde (HSFn-488) y roja (clatrina) versus distancia (eje X) de un segmento determinado por una línea blanca trazada sobre la imagen (recuadro izquierdo), en el cual se indican regiones de colocalización (barras en azul). Imagen representativa de 4 análisis independientes de perfiles de intensidades de fluorescencia, realizados sobre distintas zonas dentro de la imagen.

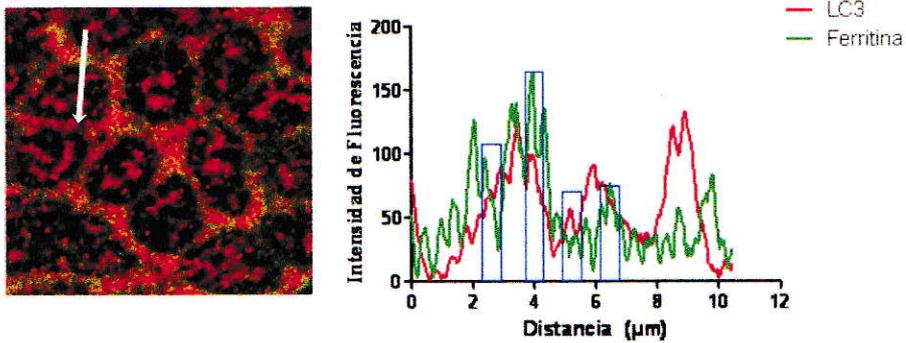
Posteriormente se realizó un experimento similar, pero en esta oportunidad las células fueron incubadas a 37 °C con HSFn-488 con el fin de evitar posibles problemas de difusión disminuida que podrían ocurrir a 4 °C (Figura 5). Nuevamente, el experimento mostró la presencia de píxeles amarillos con una distribución predominante en las regiones membranosas, señalando posible colocalización entre HSFn-488 y clatrina, (Figura 5a, ampliación de zona delimitada). También fue posible observar coincidencia de picos de intensidades de fluorescencia relativas roja y verde (al menos 4 eventos de coincidencia de fluorescencia para ambas señales, barras en azul), distribuidos principalmente en regiones membranosas, como también en regiones cercanas a la membrana celular (Figura 5b), sugiriendo que ambas moléculas estarían compartiendo una localización subcelular.

El conjunto de estas evidencias sugieren que HSFn-488 está interactuando apicalmente con clatrina, señalando que el inicio del proceso endocítico de Fn exógena estaría mediado por vesículas cubiertas por clatrina.

(a)



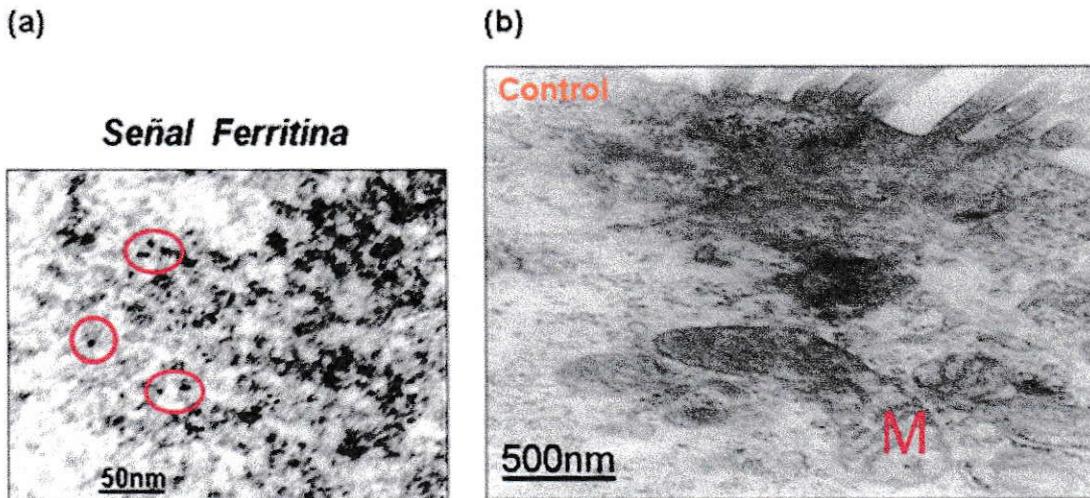
(b)



**Figura 5. Inmunocolocalización de HSFn-488 con vesículas cubiertas por clatrina en**

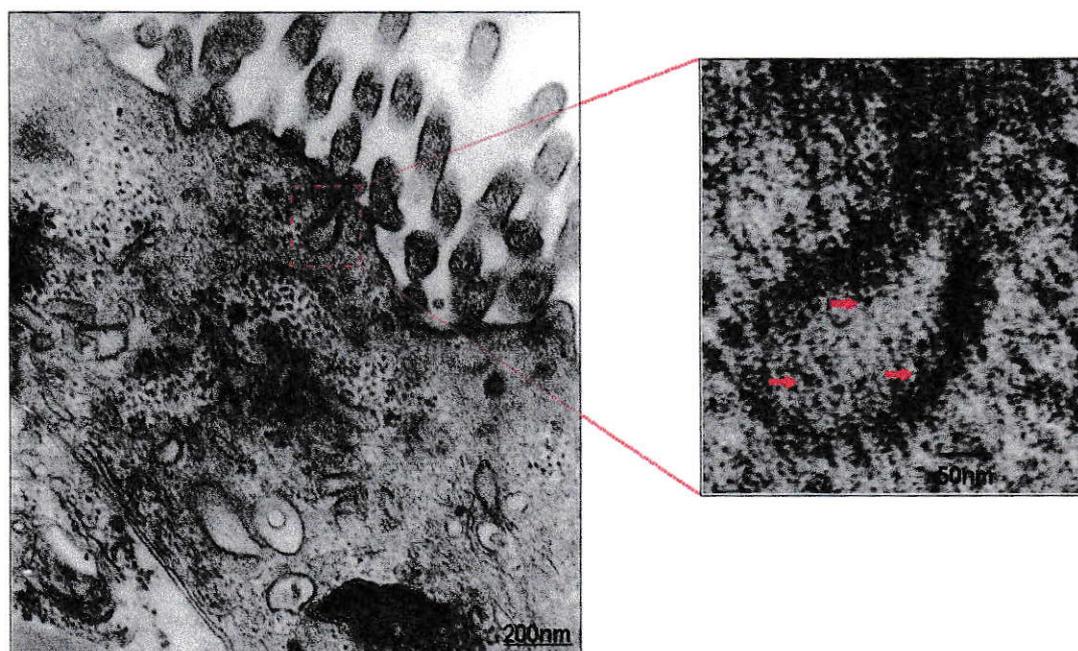
**células incubadas a 37 °C.** Células Caco-2 se incubaron por el dominio apical con 30 nM HSFn-488 por 20 min a 37 °C. Posteriormente se fijaron y la presencia de clatrina se determinó con anticuerpo contra clatrina detectado con anti-IgG marcado con AlexaFluor 546. **(a)** Corte óptico del dominio apical mostrando fluorescencia de clatrina (rojo) y de HSFn-488 (verde). El panel inferior izquierdo muestra la sobreposición de las señales roja y verde. El panel inferior derecho muestra una ampliación del recuadro mostrado en la imagen de sobreposición. **(b)** Representación gráfica (recuadro derecho) de las intensidades relativas de fluorescencia (eje Y) de la señal verde (HSFn-488) y roja (clatrina) versus distancia (eje X) de un segmento determinado por una línea blanca trazada sobre la imagen (recuadro izquierdo), en el cual se indican regiones de colocalización (barras en azul). Imagen representativa de 4 análisis independientes de perfiles de intensidades de fluorescencia, realizados sobre distintas zonas dentro de la imagen.

A nivel de microscopía electrónica de transmisión (MET) se logró identificar la señal característica de HSFn. Fn, al ser electrón-densa (propiedad adquirida por su alto contenido de Fe) tiene la capacidad de reflejar el haz incidente de electrones, adquiriendo una señal característica con un diámetro entre 9 y 12 nm (Harrison y Arisio, 1996). Aprovechando la propiedad que tiene esta proteína, capacidad de almacenar alrededor de 4500 átomos de Fe, se pudo observar la existencia de partículas electrón-densas con un diámetro aproximado de 15 nm (Figura 6a). La ausencia de esta señal se evidencia en células controles, las cuales no son tratadas con estímulos de HSFn (Figura 6b), y en donde es posible observar el dominio apical de una célula Caco-2, con sus microvellosidades apicales y compartimentos vesiculares y citoplasmáticos.



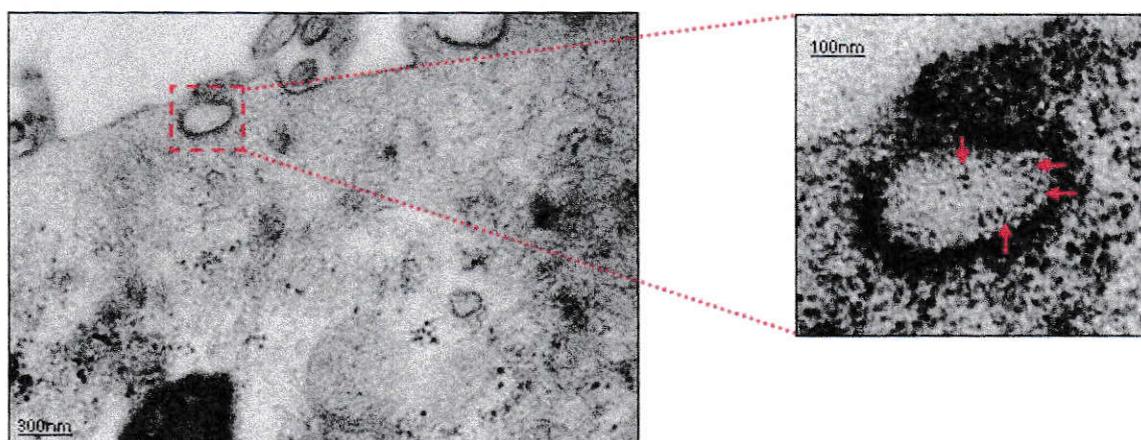
**Figura 6. Microfotografía electrónica de ferritina exógena y una monocapa de células Caco-2. (a)** Señal característica (gránulos dentro de círculos rojos) de Fn exógena (HSFn). **(b)** Células Caco-2 controles, denotando una región del dominio apical. M: mitocondria.

La posibilidad de colocalización entre Fn exógena y clatrina fue mayormente explorada mediante MET. A través de esta metodología, se logró determinar claramente la estructura del dominio apical de una células Caco-2, y formación de invaginaciones apicales cubiertas por clatrina (Shurety y cols., 1996; Smith y cols., 2007; Torgersen y cols., 2001), en cuyo interior existen señales electrón-densas características de HSFn, distinguibles de la señal electrón-densa de la cubierta de clatrina que forma la invaginación (Figura 7, ampliación de zona delimitada).



**Figura 7. Invaginación cubierta por clatrina.** La imagen exhibe región del dominio apical de una célula Caco-2, mostrando una zona apical con invaginación cubierta por clatrina (microfotografía izquierda). Señal característica de HSFn (flechas rojas) al interior de una invaginación cubierta por clatrina en la membrana apical (ampliación de zona apical, recuadro derecho).

A través de MET, se pudo también observar la presencia de partículas con densidad y tamaños característicos de Fn exógena (HSFn), al interior de una vesícula apical cubierta por clatrina en etapas finales de formación, como se muestra en la figura 8 (ampliación de zona delimitada). Este tipo de vesículas cubiertas por clatrina han sido anteriormente descritas en la misma línea celular utilizada en esta tesis (Shurety y cols., 1996) y adicionalmente en otros tipos celulares (Smith y cols., 2007; Torgersen y cols., 2001).



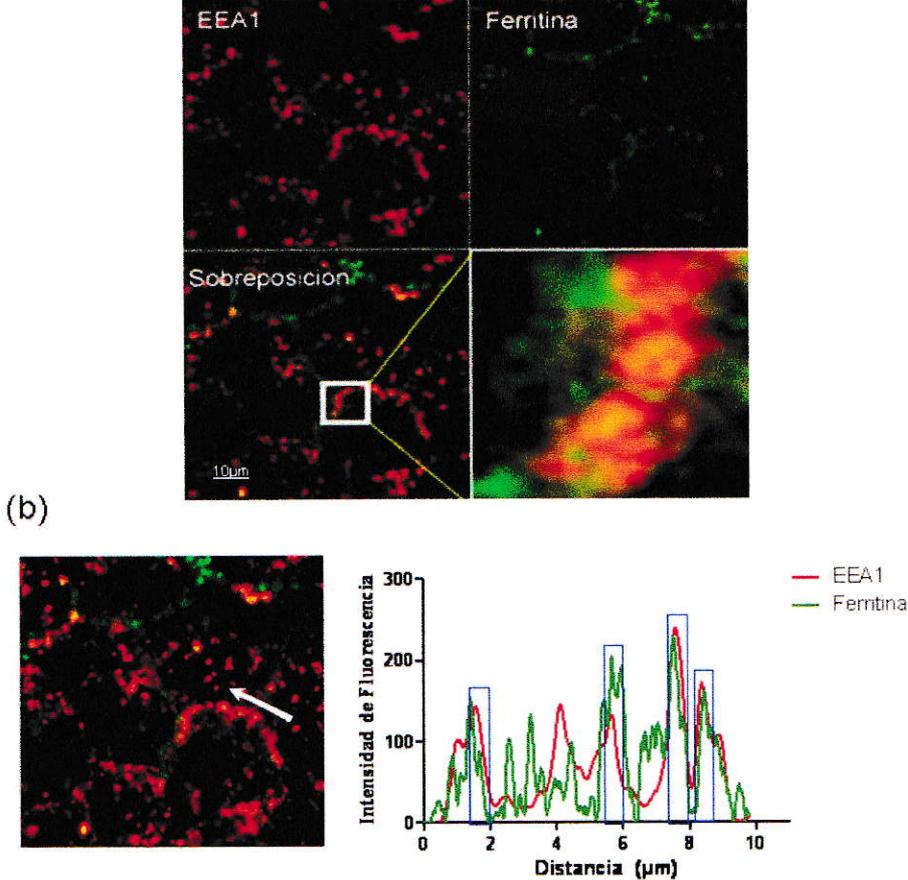
**Figura 8. Determinación de presencia de ferritina exógena en vesícula cubierta por clatrina.** Región del dominio apical de una célula Caco-2 exhibiendo zona apical con invaginación cubierta por clatrina (microfotografía izquierda). Se observa señal característica de HSFn (flechas rojas) al interior de una vesícula cubierta por clatrina que está finalizando su proceso de formación desde la membrana apical (ampliación de zona apical, recuadro derecho).

La integración de los resultados de inmunofluorescencia y de MET, sugiere que el proceso de endocitosis apical de Fn exógena por células Caco-2 involucra la participación de invaginaciones y vesículas cubiertas por clatrina.

### **3.2 Determinación de la presencia de ferritina exógena en endosoma temprano o de seleccionamiento.**

A modo de poder determinar la posible destinación de Fn a compartimentos endosomales tempranos se realizó inmunocitoquímica utilizando HSFn-488. Las células incubadas con 30 nM HSFn-488 durante 20 min a 37 °C fueron fijadas e incubadas con anticuerpo anti-EEA1. Las muestras se analizaron mediante microscopia confocal, y las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa LSM del microscopio confocal. La marca tanto de EEA1 como de HSFn-488 se encontraron preferentemente en el citoplasma periférico (Figura 9a). La ampliación de una región específica de la monocapa mostró la presencia de píxeles con tonalidad amarilla en regiones granulares (Figura 9a, ampliación de zona delimitada). El análisis de intensidades de fluorescencia muestra el trazo de una línea representativa comenzando desde un punto con sólo la señal de fluorescencia del canal rojo (EEA1), observando una alta intensidad de fluorescencia roja, siguiendo a través de puntos en donde se aprecia la existencia de intensidades de fluorescencia coincidentes (al menos 4 eventos de coincidencia, barras en azul) para ambas señales de fluorescencia (Figura 9b), denotando que la marca correspondiente a HSFn-488 se correlaciona con la presencia de la señal de EEA1. El estudio de intensidades de fluorescencia (bajo la línea trazada sobre la imagen) indicó la presencia de picos de intensidades de fluorescencia coincidentes para ambas señales de fluorescencia, distribuidos predominantemente en regiones cercanas a la membrana celular (Figura 9b).

Esta coexistencia de ambas señales de intensidades de fluorescencia a la misma distancia de la gráfica se transforma en una evidencia de la posible colocalización de ambas moléculas, sugiriendo que Fn exógena una vez internalizada, a través de vesículas cubiertas por clatrina, seguiría su tránsito vesicular por medio de endosomas. Por otro lado, se pudo identificar la presencia de píxeles amarillos con una distribución granular tanto a nivel de membrana como también en regiones periféricas de membrana celular (Figura 9a, superposición), señalando que ambas moléculas estarían compartiendo una localización subcelular.

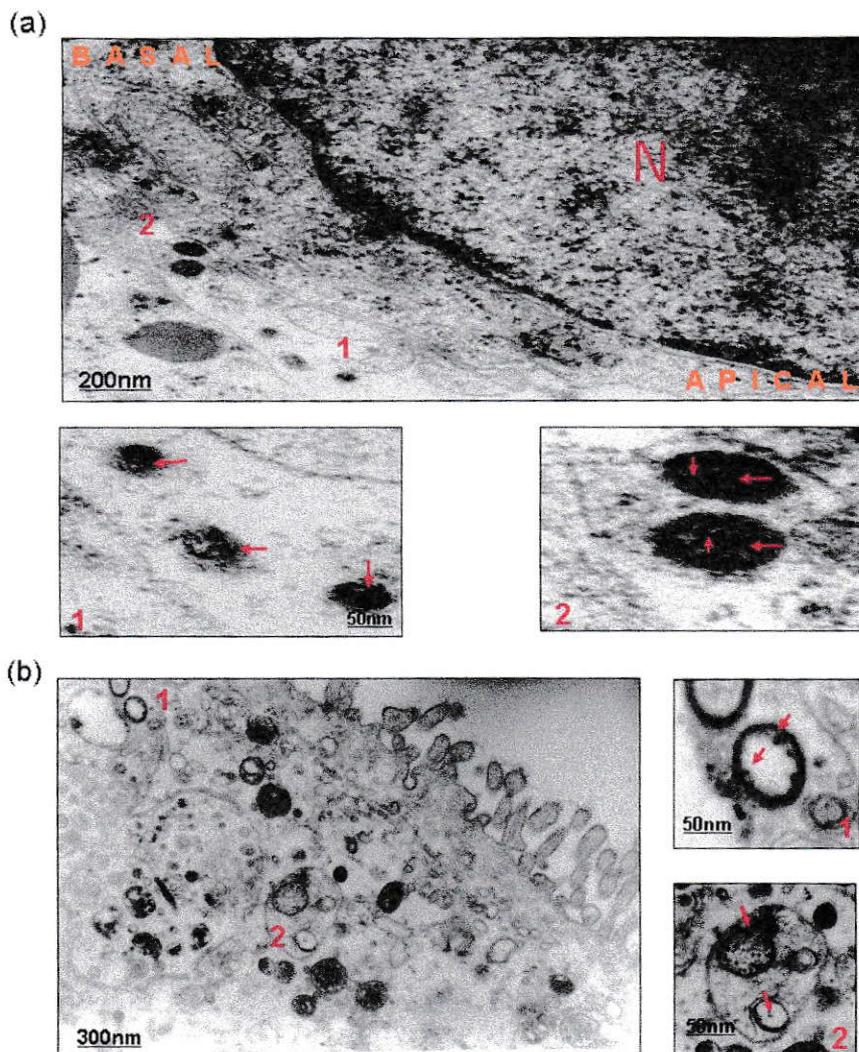


**Figura 9. Inmunocolocalización de HSFn-488 con endosomas tempranos.** Células

Caco-2 fueron incubadas por el dominio apical con 30 nM HSFn-488 por 20 min a 37 °C. Posteriormente se fijaron y la presencia de endosomas se determinó con anticuerpo anti-EEA1 detectado con anti-IgG marcado con AlexaFluor 546. **(a)** Corte óptico del dominio apical mostrando fluorescencia de EEA1 (rojo) y de HSFn-488 (verde). El panel inferior izquierdo muestra la sobreposición de las señales roja y verde. El panel inferior derecho muestra una ampliación del recuadro mostrado en la imagen de sobreposición. **(b)** Representación gráfica (recuadro derecho) de las intensidades relativas de fluorescencia (eje Y) de la señal verde (HSFn-488) y roja (EEA1) versus distancia (eje X) de un segmento determinado por una línea blanca trazada sobre la imagen (recuadro izquierdo), en el cual se indican regiones de colocalización (barras en azul). Imagen representativa de 4 análisis independientes de perfiles de intensidades de fluorescencia, realizados sobre distintas zonas dentro de la imagen.

Paralelamente se evaluó la presencia de HSFn en endosomas tempranos a través de MET (Figura 10). En estas microfotografías se puede evidenciar la presencia de una señal correspondiente a HSFn (según forma y tamaño mostrado para HSFn en Fig. 6) en endosomas que en su envoltura aún poseen clatrina (Figura 10b, ampliación de zona 1).

En la figura 10a, se pueden evidenciar compartimentos endosomales, con un diámetro que varía entre los 100 y 200 nm, en el citoplasma perinuclear que sugieren la existencia de un flujo vesicular desde la zona 1, hacia zona 2. Este flujo vesicular está constituido de compartimentos endosomales que en su interior presentan una señal correspondiente a HSFn, de igual forma es posible denotar una señal un poco más difusa y de mayor tamaño, la cual creemos que podrían corresponder a complejos multimoleculares de HSFn. Adicionalmente se puede observar la presencia de compartimentos multivesiculares en el dominio apical, con un diámetro variable entre los 500 y 900 nm, y que contienen endosomas que en su interior presentan granulaciones correspondientes a la señal de HSFn (Figura 10b, ampliación de zona 2).



**Figura 10. Determinación de la presencia de ferritina exógena en endosomas del citoplasma periférico.** (a) La imagen exhibe región perinuclear de una célula Caco-2 presentando una serie de vesículas endocíticas (microfotografía superior) que en su interior presentan granulación correspondiente a señal característica de HSFn (flechas rojas) y complejos moleculares de HSFn (ampliación zona 1 y 2, recuadros inferiores). (b) Región del dominio apical de célula Caco-2, exhibiendo compartimentos multivesiculares (microfotografía izquierda). Se aprecia señal característica de HSFn (flechas rojas) al interior de vesícula cubierta por clatrina (ampliación zona 1, recuadro derecho). Cuerpo multivesicular con vesículas internas conteniendo señal característica (flechas rojas) de HSFn (ampliación zona 2, recuadro derecho).

### **3.3 Determinación de la presencia de ferritina exógena en compartimentos autofágicos.**

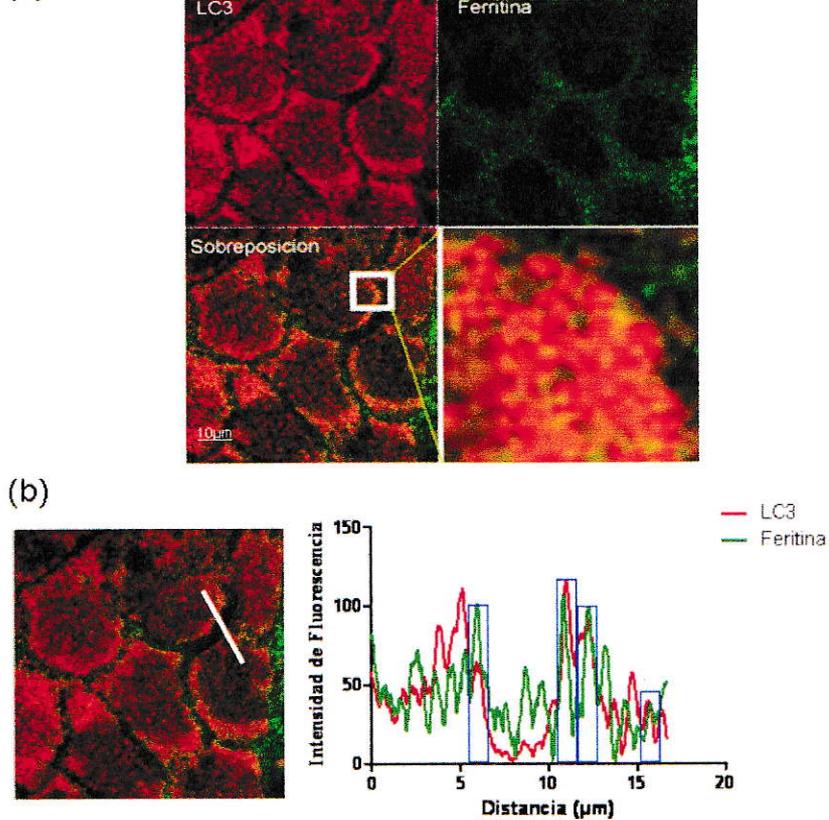
La determinación de la presencia de Fn exógena en compartimentos autofágicos se evaluó a través de inmunofluorescencia utilizando HSFn marcada con AlexaFluor 488 (HSFn-488) y el marcador molecular de superficie de autofagosomas LC3. Esta proteína se encuentra asociada a la membrana de este compartimento hasta el momento en que el autofagosoma se fusiona con el compartimento lisosomal (Mizushima, 2004).

La colocalización entre HSFn-488 y LC3 se evaluó bajo condiciones experimentales normales y condiciones que modifican la actividad autofágica o lisosomal. Estas fueron: i) condición estándar, ii) condición de depleción de suero, iii) condición de inhibición de la autofagocitosis y iv) condición de inhibición de la actividad lisosomal.

#### **3.3.1 Condición de cultivo estándar.**

La colocalización entre HSFn-488 y LC3 se determinó en células Caco-2 mantenidas en medio de cultivo con 10 % suero (condición normal de cultivo), esta condición es equivalente a poseer una concentración aproximada de 5  $\mu$ M de Fe (Figura 11). Bajo estas condiciones, se encontró una significativa coincidencia espacial de fluorescencia verde (HSFn-488) y fluorescencia roja (LC3) en dominios citoplasmáticos. Mediante un aumento de una zona en particular se pudo identificar la presencia de píxeles amarillos, sugerentes de que ambas moléculas comparten una localización subcelular (Figura 11a, ampliación de zona delimitada).

El análisis de los patrones de intensidades relativas de fluorescencia a lo largo de la línea trazada sobre la imagen, mostró regiones en los que coinciden picos de intensidad de fluorescencia para ambas señales (por lo menos 4 eventos de coincidencia de fluorescencia para ambas señales, barras en azul) como también regiones en los que predomina la señal de LC3 (Figura 11b). La distribución de estas intensidades de fluorescencia coincidentes fue observada principalmente en regiones del citoplasma periférico de las células involucradas en este análisis (regiones de células bajo la línea trazada sobre la imagen).



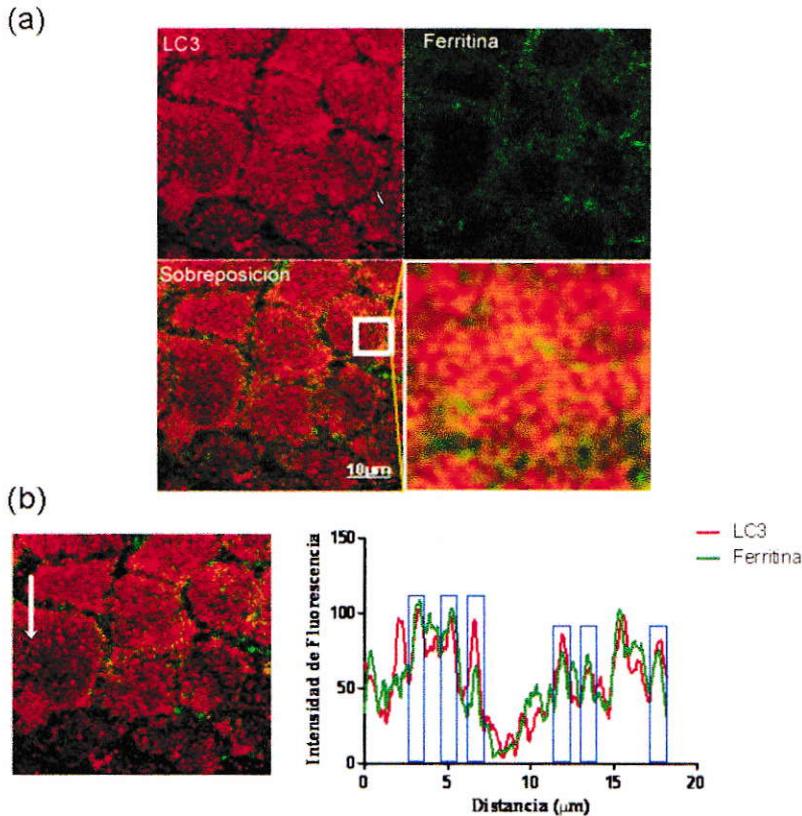
**Figura 11. Inmunocolocalización de HSFn-488 con compartimentos autofágicos en**

**células cultivadas bajo condiciones estándar.** Células Caco-2 cultivadas en medio de cultivo con 10 % suero fueron incubadas por el dominio apical con 30 nM HSFn-488 por 20 min a 37 °C. Posteriormente se fijaron y la presencia de autofagosomas se determinó con anticuerpo anti-LC3 detectado con anti-IgG marcado con AlexaFluor 546. **(a)** Corte óptico mostrando fluorescencia de LC3 (rojo) y de HSFn-488 (verde). El panel inferior izquierdo muestra la sobreposición de las señales roja y verde. El panel inferior derecho muestra una ampliación del recuadro mostrado en la imagen de sobreposición. **(b)** Representación gráfica (recuadro derecho) de las intensidades relativas de fluorescencia (eje Y) de la señal verde (HSFn-488) y roja (LC3) versus distancia (eje X) de un segmento determinado por una línea blanca trazada dentro de la imagen (recuadro izquierdo), en el cual se indican regiones de colocalización (barras en azul). Imagen representativa de 4 análisis independientes de perfiles de intensidades de fluorescencia, realizados sobre distintas zonas sobre la imagen.

### 3.3.2 Condición de depleción de suero.

Para lograr una condición de hambruna celular, en la que la autofagocitosis está aumentada (Mortimore y Pösö, 1987), las células Caco-2 se mantuvieron con medio de cultivo sin suero por 8 h. Posteriormente, tras un pulso con HSFn-488, se evaluó la colocalización de las señales fluorescentes de LC3 y HSFn-488 (Figura 12).

El análisis de los patrones de intensidades relativas de fluorescencia nos mostró un mayor grado de intensidad del canal rojo (marcador LC3), esto debido a que en medio sin suero se estimula la expresión de LC3 y la formación de autofagosomas (Figura 12). La condición de privación de nutrientes indujo un aumento en la intensidad de fluorescencia del marcador de autofagosomas (LC3), y aumentó su redistribución por todo el área celular. La marca de LC3 se encontró ampliamente distribuida en el citoplasma en tanto que la marca de HSFn-488 estuvo más circunscrita al citoplasma periférico (Figura 12a). Se observaron múltiples zonas que presentan pixeles amarillos, con distribución predominantemente citoplasmática, sugiriendo que ambas moléculas comparten una localización subcelular (Figura 12a, ampliación de zona delimitada). El análisis de los patrones de intensidades relativas de fluorescencia a lo largo de la línea trazada sobre la imagen, mostró regiones en las que se aprecia coincidencia de picos de fluorescencia para ambas señales (al menos 6 eventos de coincidencia de fluorescencia de ambas señales, barras en azul), insinuando la posible colocalización de ambas moléculas (Figura 12b).

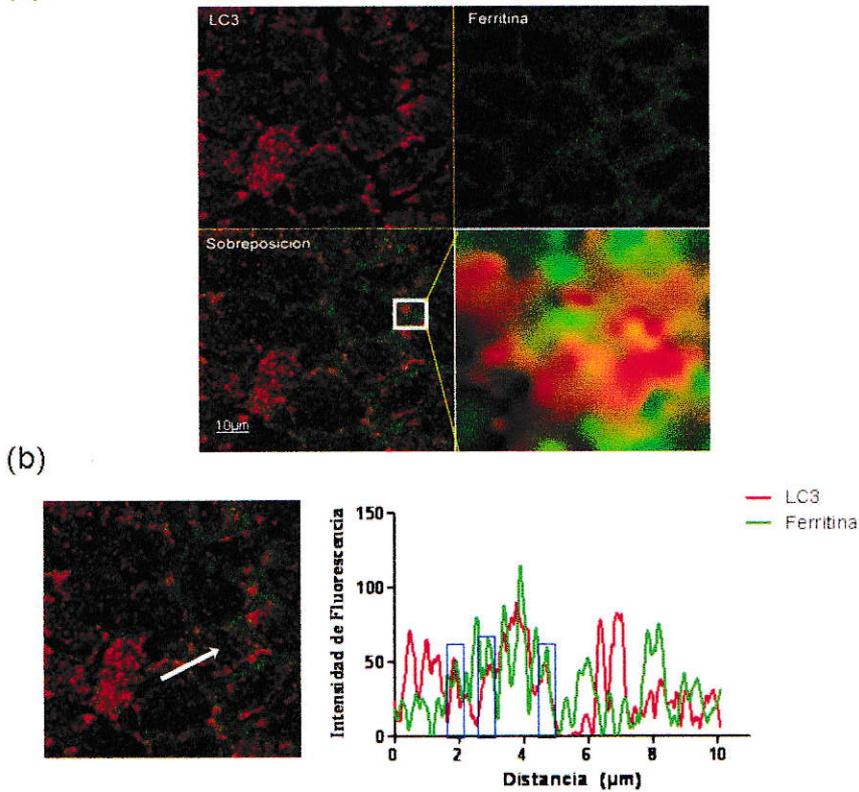


**Figura 12. Inmunocolocalización de HSFn-488 con compartimentos autofágicos en células cultivadas en condiciones de privación de nutrientes.** Células Caco-2 cultivadas en medio de cultivo sin suero por 6 h, fueron incubadas por el dominio apical con 30 nM HSFn-488 por 20 min a 37 °C. Posteriormente se fijaron y la presencia de autofagosomas se determinó con anticuerpo anti-LC3 detectado con anti-IgG marcado con AlexaFluor 546. **(a)** Corte óptico mostrando fluorescencia de LC3 (rojo) y de HSFn-488 (verde). El panel inferior izquierdo muestra la sobreposición de las señales roja y verde. El panel inferior derecho muestra una ampliación del recuadro mostrado en la imagen de sobreposición. **(b)** Representación gráfica (recuadro derecho) de las intensidades relativas de fluorescencia (eje Y) de la señal verde (HSFn-488) y roja (LC3) versus distancia (eje X) de un segmento determinado por una línea blanca trazada sobre la imagen (recuadro izquierdo), en el cual se indican regiones de colocación (barras en azul). Imagen representativa de 4 análisis independientes de perfiles de intensidades de fluorescencia, realizados sobre distintas zonas dentro de la imagen.

### 3.3.3 Condición de inhibición de la autofagocitosis.

Células Caco-2 fueron tratadas con 10 mM de 3-metiladenina (3-MeA) por 90 min, con el fin de poder inhibir la formación y presencia de autofagosomas (Senglen y Gordon, 1982). En estas condiciones, se observó una menor intensidad de la fluorescencia debida a LC3 (Figura 13a), posiblemente debido a que 3-MeA inhibe la expresión de LC3 y la formación de autofagosomas. A pesar de esta disminución en el nivel de intensidad de fluorescencia para LC3, se pudo observar nuevamente zonas en donde coexisten ambas señales de fluorescencia. Al igual que en la condición normal de cultivo, se identificó la presencia de píxeles amarillos, aunque en una menor proporción a la condición control, sugiriendo que ambas moléculas estarían compartiendo una misma localización subcelular (Figura 13a, ampliación de zona delimitada).

A nivel de análisis de los patrones de intensidades relativas de fluorescencia a lo largo de la línea trazada sobre la imagen, se pudo observar la presencia de regiones con intensidades de fluorescencia coincidentes (por lo menos 3 eventos de coincidencia de fluorescencia, barras en azul) para ambas señales (Figura 13b). Estas regiones disminuyeron en su frecuencia e intensidad respecto a las condiciones controles (10 % suero) y privación de nutrientes (medio sin suero), dado a la presencia de 3-MeA en el medio de cultivo. La presencia de este inhibidor redujo la distribución y el nivel de intensidad de fluorescencia del marcador de autofagosomas (LC3).

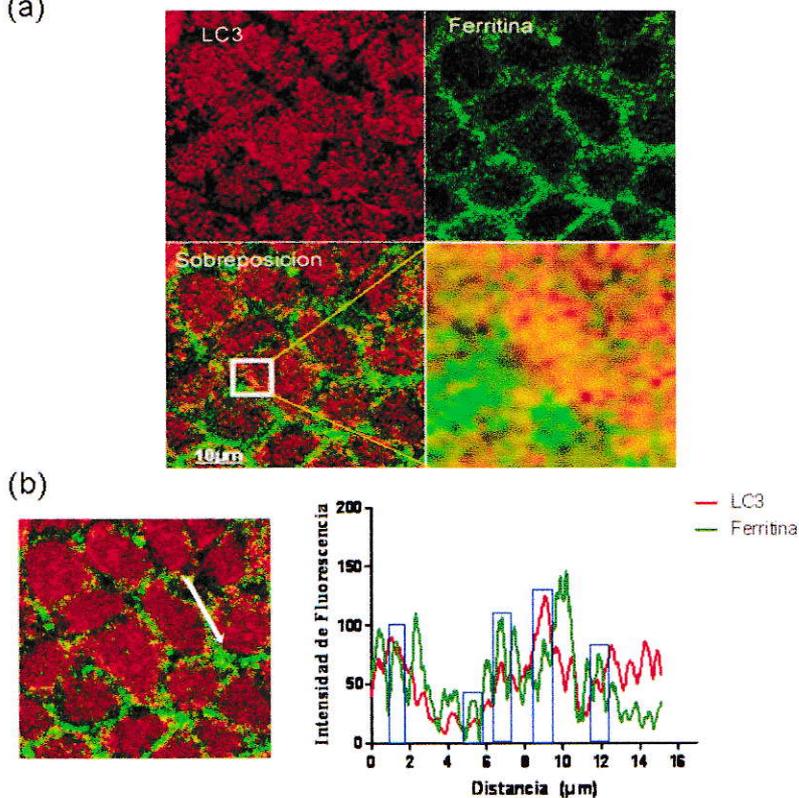


**Figura 13. Inmunocolocalización de HSFn-488 con compartimentos autofágicos en**

**células cultivadas bajo condición de inhibición de la autofagocitosis.** Células Caco-2 estimuladas por 90 min con 10 mM de inhibidor de complejos autofágicos 3-MeA fueron incubadas por el dominio apical con 30 nM HSFn-488 por 20 min a 37 °C. Posteriormente se fijaron y la presencia de autofagosomas se determinó con anticuerpo anti-LC3 detectado con anti-IgG marcado con AlexaFluor 546. (a) Corte óptico mostrando fluorescencia de LC3 (rojo) y de HSFn-488 (verde). El panel inferior izquierdo muestra la sobreposición de las señales roja y verde. El panel inferior derecho muestra una ampliación del recuadro mostrado en la imagen de sobreposición. (b) Representación gráfica (recuadro derecho) de las intensidades relativas de fluorescencia (eje Y) de la señal verde (HSFn-488) y roja (LC3) versus distancia (eje X) de un segmento determinado por una línea blanca trazada sobre la imagen (recuadro izquierdo), en el cual se indican regiones de colocalización (barras en azul). Imagen representativa de 4 análisis independientes de perfiles de intensidades de fluorescencia, realizados sobre distintas zonas dentro de la imagen.

### 3.3.4 Condición de inhibición de la actividad lisosomal.

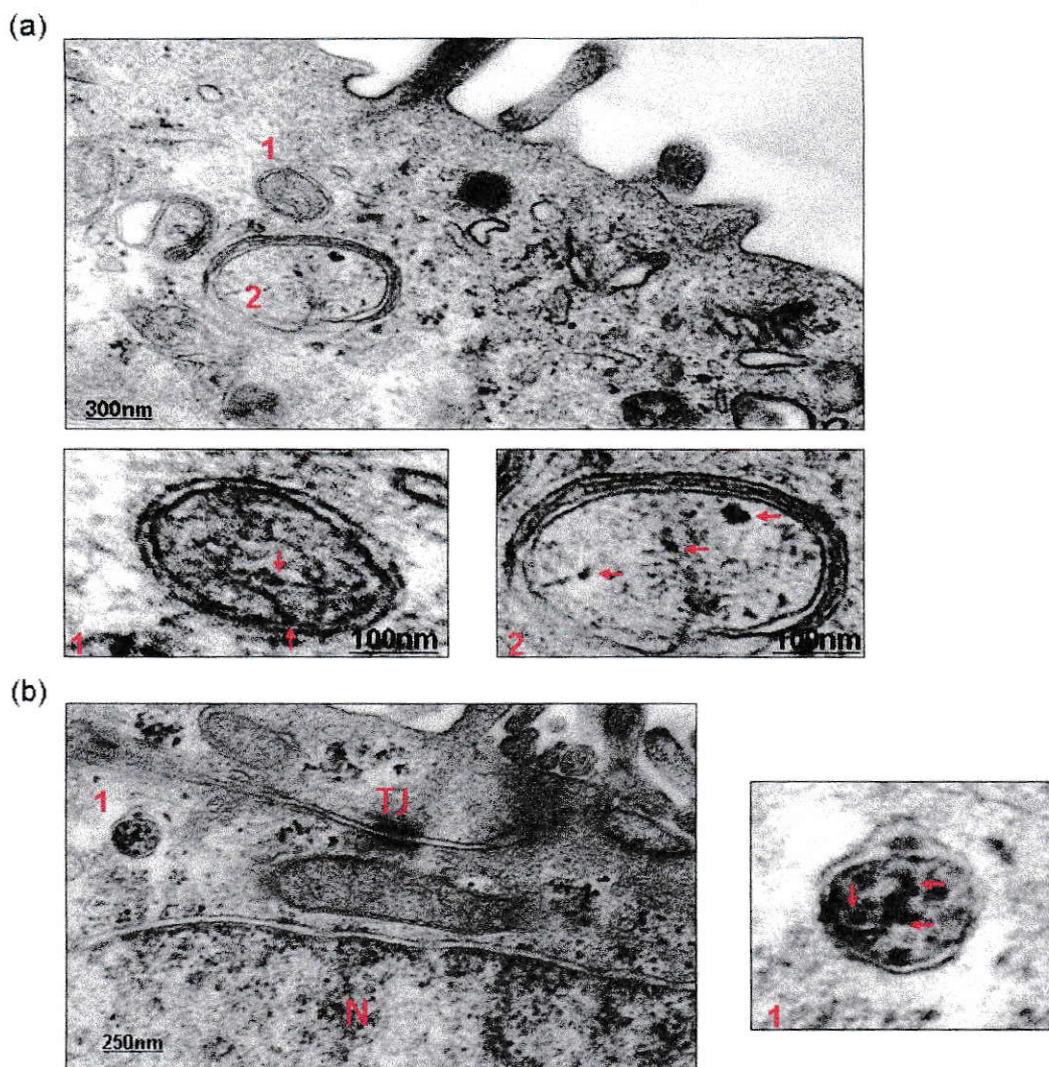
Células Caco-2 fueron tratadas con 100  $\mu$ M de cloroquina por 90 min, con el fin de inhibir la actividad lisosomal. En estas condiciones, se observó un mayor grado de intensidad de la fluorescencia de HSFn-488 (Figura 14a), posiblemente debido a que el tratamiento con cloroquina impidió que HSFn-488 fuese degradada. La ampliación en tamaño de una región específica muestra un aumento en el número de píxeles amarillos (Figura 14a, ampliación de zona delimitada), en comparación a la condición control (10 % suero), sugiriendo que tanto moléculas HSFn-488 como las moléculas marcadores LC3 estarían compartiendo una misma localización subcelular. El análisis de las intensidades relativas de fluorescencia través de la línea trazada mostró un aumento del número de regiones celulares con intensidades de fluorescencia coincidentes para ambas señales de fluorescencia (al menos 5 eventos de coincidencia de fluorescencia para ambas señales, barras en azul), este aumento se podría deber dado que al inhibir la actividad lisosomal se impide la degradación de HSFn-488, aumentando las interacciones del marcador de autofagosomas LC3, y de esta manera aumentan las intensidades de fluorescencia coincidentes para ambas señales (Figura 14b).



**Figura 14. Inmunocolocalización de HSFn-488 con compartimentos autofágicos bajo**

**condición de inhibición de la actividad lisosomal.** Células Caco-2 estimuladas por 90 min con 100  $\mu\text{M}$  de inhibidor de la actividad lisosomal (cloroquina) fueron incubadas por el dominio apical con 30 nM HSFn-488 por 20 min a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se fijaron y la presencia de autofagosomas se determinó con anticuerpo anti-LC3 detectado con anti-IgG marcado con AlexaFluor 546. **(a)** Corte óptico mostrando fluorescencia de LC3 (rojo) y de HSFn-488 (verde). El panel inferior izquierdo muestra la sobreposición de las señales roja y verde. El panel inferior derecho muestra una ampliación del recuadro mostrado en la imagen de sobreposición. **(b)** Representación gráfica (recuadro derecho) de las intensidades relativas de fluorescencia (eje Y) de la señal verde (HSFn-488) y roja (LC3) versus distancia (eje X) de un segmento determinado por una línea blanca trazada sobre la imagen (recuadro izquierdo), en el cual se indican regiones de colocalización (barras en azul). Imagen representativa de 4 análisis independientes de perfiles de intensidades de fluorescencia, realizados sobre distintas zonas dentro de la imagen.

Los resultados de inhibición de la actividad lisosomal con cloroquina fueron correlacionados con observaciones a nivel de microscopía electrónica de transmisión, en donde las células fueron incubadas con HSFn. De las imágenes obtenidas, se puede observar la presencia de compartimentos de doble membrana similares al descrito en la literatura y que son señalados como autofagosomas (Figura 15) (Stromhaug y cols., 1998). Estas imágenes muestran la presencia de compartimentos de doble membrana (autofagosomas) distribuidos en el dominio apical (Figura 15a), con un diámetro que varia entre los 200 y 450 nm, y que en su interior presentan una señal similar a HSFn (Figura 15a, ampliación de zona 1 y 2) y adicionalmente una señal un poco más difusa y de mayor tamaño (Figura 15a, ampliación de zona 2), correspondiente tal vez a la señal de HSFn formado complejos moleculares (Figura 15a, ampliación de zona 2 y 3). Adicionalmente es posible observar la presencia de autofagosomas en regiones perinucleares (Figura 15b), con un diámetro aproximado de 220 nm, y que en su interior presenta señales electrón-densas correspondientes con el diámetro de HSFn (Figura 15b, ampliación de zona 2).

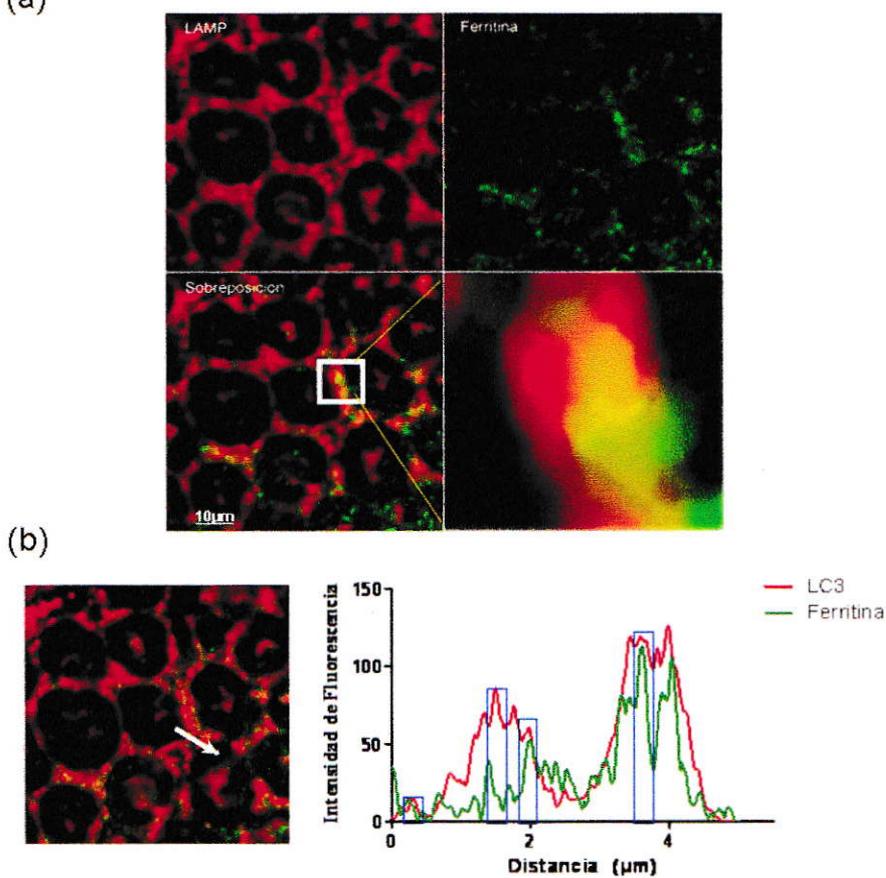


**Figura 15. Determinación de la presencia de ferritina exógena en putativos compartimentos autofágicos.** (a) Imagen de una región del dominio apical de célula Caco-2, exhibiendo compartimentos de doble membrana, posiblemente autofagosomas (microfotografía superior), presentando señal característica de HSFn (flechas rojas), y complejos moleculares de HSFn al interior de compartimentos de doble membrana (ampliación zona 1 y 2, recuadros inferiores). (b) Imagen mostrando región apical y perinuclear de una célula Caco-2, exhibiendo un compartimento autofágico en región perinuclear (microfotografía izquierda), el cual presenta señal característica de HSFn (flechas rojas), y complejos moleculares de HSFn en su interior (ampliación zona 1, recuadro derecho). N: Núcleo; TJ: Uniones estrechas.

### 3.4 Determinación de ferritina exógena en compartimentos lisosomales.

Con el fin de poder comprobar la presencia de Fn exógena en compartimentos lisosomales, se realizó inmunocitoquímica utilizando HSFn-488 y el marcador lisosomal LAMP1 (proteína asociada a membrana lisosomal 1). Las células incubadas con 30 nM HSFn-488 durante 20 min a 37 °C, fueron fijadas e incubadas con anticuerpo anti-LAMP1. Las muestras fueron examinadas a través de microscopia confocal y las imágenes obtenidas se analizaron con el programa LSM del microscopio confocal. LAMP1 mostró una distribución a través de todo el citoplasma, en tanto que, como en otras observaciones, la fluorescencia de HSFn-488 fue más acentuada en el citoplasma periférico. La sobreposición de fluorescencias mostró regiones granulares con píxeles de tonalidad amarilla (Figura 16a), este hecho es más evidente al realizar un aumento de una región específica dentro de la imagen de sobreposición (Figura 16a, ampliación de zona delimitada).

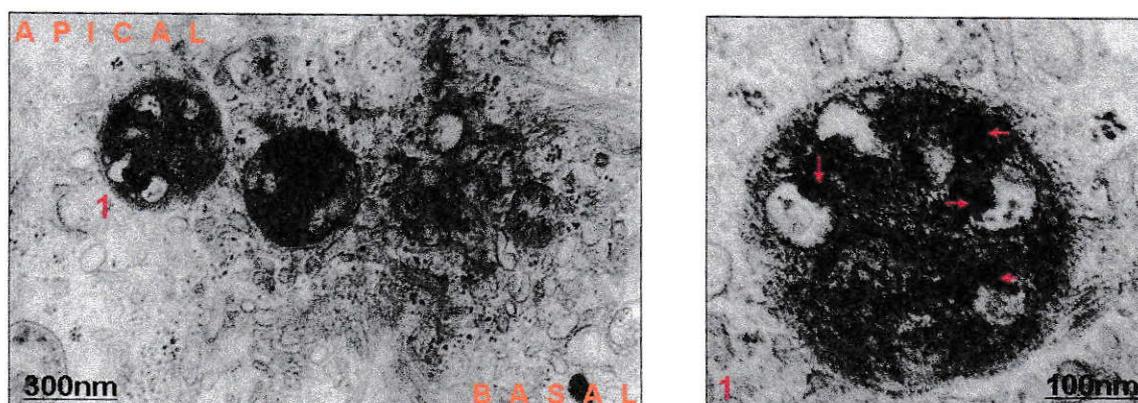
El análisis de los perfiles de intensidades de fluorescencia mostró regiones con alta intensidad de fluorescencia roja (LAMP1), seguida de regiones en donde coexisten ambas señales de fluorescencia (por lo menos 4 eventos de coincidencia de fluorescencia para ambas señales, barras en azul), lográndose apreciar regiones con intensidades altas de fluorescencia que son coincidentes para ambas señales de fluorescencia (Figura 16b), señalando que ambas moléculas comparten una localización subcelular.



**Figura 16. Inmunocolocalización de HSFn-488 con compartimentos lisosomales.**

Células Caco-2 fueron incubadas por el dominio apical con 30 nM HSFn-488 por 20 min a 37 °C. Posteriormente se fijaron y la presencia de lisosomas se determinó con anticuerpo anti-LAMP1 detectado con anti-IgG marcado con AlexaFluor 546. **(a)** Corte óptico mostrando fluorescencia de LAMP1 (rojo) y de HSFn-488 (verde). El panel inferior izquierdo muestra la sobreposición de las señales roja y verde. El panel inferior derecho muestra una ampliación del recuadro mostrado en la imagen de sobreposición. **(b)** Representación gráfica (recuadro derecho) de las intensidades relativas de fluorescencia (eje Y) de la señal verde (HSFn-488) y roja (LAMP1) versus distancia (eje X) de un segmento determinado por una línea blanca trazada sobre la imagen (recuadro izquierdo), en el cual se indican regiones de colocalización (barras en azul). Imagen representativa de 4 análisis independientes de perfiles de intensidades de fluorescencia, realizados sobre distintas zonas sobre la imagen.

De manera complementaria, la determinación de la presencia de HSFn en compartimentos lisosomales fue evaluada a través de MET (Figura 17). Se observó HSFn en cuerpos multivesiculares de membrana simple, del tamaño reportado para lisosomas positivos para fosfatasa ácida (Vincent y Spicer, 1981). En estos cuerpos (con un diámetro aproximado de 400 nm), ya no fue posible observar moléculas de HSFn aisladas, sino que se logró observar cuerpos conteniendo vesículas que en su interior presentan una gran cantidad de material electrón-denso un poco más difuso, que posiblemente corresponda a moléculas de HSFn parcialmente degradadas por hidrolasas presentes en el compartimento degradativo, y cuyo material electrón-denso (núcleo de Fe mineralizado) contenido en ellas es liberado al lumen de las vesículas presentes en el compartimento multivesicular. (Figura 17, ampliación de zona 1).



**Figura 17. Determinación de la presencia de ferritina exógena en putativos compartimentos lisosomales.** Región citoplasmática de una célula Caco-2, exhibiendo compartimentos multivesiculares, los cuales presentan cuerpos electrón-densos en su interior (microfotografía izquierda), correspondientes posiblemente a complejos de HSFn (flechas rojas) degradados (ampliación zona 1, recuadro derecho).

#### 4. DISCUSIÓN

Los resultados mostrados en la presente tesis caracterizaron en células Caco-2 compartimentos intracelulares en los que se encuentra Fn exógena, adicionada externamente desde el medio apical. Anteriormente habíamos encontrado que la internalización de SBFn a través de endocitosis apical en enterocitos es un mecanismo de absorción de Fe extremadamente eficiente, debido a la gran cantidad de Fe presente en la moléculas de SBFn internalizada (San Martín y cols., 2008).

La internalización de Fn animal ha sido observada en hepatocitos (Adams y cols., 1988; 1990), lipocitos (Ramm y cols., 1994), precursores eritroides (Gelvan y cols., 1996), cerebro de ratón (Hulet y cols., 1999), y membrana placental, en donde juega un importante rol en el transporte de Fe materno-fetal. (Liao y cols., 2001). El hallazgo de que una proteína de dominio mucina y dominio de inmunoglobulina 2 (TIM2) en riñón e hígado es un receptor específico para Fn-H endógena en ratón (Chen y cols., 2005), complementa estudios anteriores sobre sitios de superficie celular saturables que son partícipes en la internalización de Fn. Adicionalmente, se sugiere la reabsorción de Fe en el intestino desde Fn endógena liberada durante el recambio de enterocitos (Hunt y Roughead, 1999) puede depender de interacciones entre la superficie celular y Fn. La regulación de la internalización de Fn por el estatus de Fe celular ha sido observada para algunos tipos celulares tales como precursores eritroides y células en las microvellosidades de la placenta (Gelvan y cols., 1996; Liao y cols., 2001). Sin embargo, esta regulación por Fe parece estar ausente en hepatocitos (Adams, 1990), posiblemente dado al rol especializado hepatocitos en almacenar un exceso de Fe.

La determinación de la presencia de HSFn en vesículas cubiertas por clatrina fue evaluada a través de microscopia confocal, en donde se encontraron dominios membranosos en los que la fluorescencia de HSFn-488 coincidió con la de clatrina, indicando una posible colocalización de ambas proteínas tanto en incubaciones a 4 como a 37 °C (Figuras 4b y 5b). Este fenómeno fue más intenso en células incubadas a 4 °C con HSFn-488. En estas circunstancias se detiene la internalización de HSFn-488, por lo que aumenta el tiempo de interacción entre HSFn-488 y las moléculas de clatrina que conforman las invaginaciones. Las evidencias de colocalización de HSFn y clatrina fueron corroboradas mediante MET, a través de la cual se pudo observar la formación de vesículas cubiertas por clatrina que en su interior presentaron una aparente señal correspondiente a HSFn. (Figuras 7 y 8).

La evidencia encontrada en esta tesis sobre colocalización HSFn-488/clatrina, sugieren fuertemente que el proceso de endocitosis apical de Fn exógena se realiza a través de invaginaciones cubiertas por clatrina. Esta observación complementa investigaciones recientes en nuestro laboratorio demostrando la dependencia de la endocitosis de SBFn de la presencia de  $\mu 2$ , un componente del complejo adaptador AP2 (San Martín y cols., 2008). Dado que la endocitosis mediada por clatrina es dependiente de receptores de membrana, nuestros hallazgos apoyan indirectamente la idea de que Fn posee un receptor específico en la superficie de los enterocitos absortivos.

Usando criterios de colocalización de coincidencia de intensidades de fluorescencia, encontramos que HSFn-488 colocalizó con EEA1 (Mu y cols., 1995), un marcador de endosoma temprano (Figura 9). Esta observación presentó un correlato con evidencia de MET en la que se encontró HSFn en compartimentos endosomales cercanos a la membrana plasmática (Figura 10). El conjunto de estas observaciones sugiere que en su proceso de internalización Fn exógena lleva a cabo la ruta canónica de la endocitosis mediada por clatrina, desde invaginaciones cubiertas por clatrina hacia endosomas tempranos (Gruenberg y Maxfield, 1995).

La autofagia es un proceso por el cual las células degradan material citosólico como organelos y ciertas proteínas citosólicas (Majeski y Dice, 2004; Massey y cols., 2004). En este proceso, los componentes citosólicos se secuestran en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, los que se fusionan con lisosomas para formar un autolisosoma (Gordon y Senglen, 1988). Interesantemente, se ha propuesto que el recambio de Fn endógena es mediado por autofagia (Hultcrantz y Glaumann, 1987; Kurz y cols., 2007).

Experimentos preliminares de nuestro laboratorio, previos a los de esta tesis, indicaron una posible incorporación de Fn exógena a autofagosomas. Esta observación dio lugar a la expectativa que, en su ruta degradativa, Fn exógena pasara por compartimentos autofágicos previo a su destinación a lisosomas. A modo de poder comprobar esta idea, se evaluó la presencia de HSFn-488 en compartimentos autofágicos, utilizando el marcador molecular LC3 (Mizushima, 2004). Se observaron abundantes puntos de colocalización entre la señal de fluorescencia correspondiente a

HSFn-488 y la de LC3 (Figura 11). Adicionalmente se logró determinar la presencia de HSFn en compartimentos de doble membrana, posiblemente autofagosomas (Figura 15).

El grado de colocalización entre HSFn-488 y LC3 se vio ligeramente aumentado condiciones de estimulación de la autofagia por depleción de suero (Figura 12) y considerablemente aumentada en condición de inhibición de la actividad lisosomal (Figura 14), en tanto que la inhibición de la autofagocitosis con 3-MeA disminuyó tanto la intensidad y distribución de fluorescencia de LC3 como su colocalización con HSFn-488 (Figura 13). Estas observaciones sugieren fuertemente que, en su ruta degradativa, Fn exógena transita por compartimentos autofagosomales. Esta es una observación importante, ya que a la fecha no existen antecedentes en enterocitos del paso de proteínas exógenas a través compartimientos autofágicos antes de ser degradadas.

Dado la presencia de Fn exógena en autofagosomas, se pensó en la posibilidad de que la ruta degradativa fuese mediada a través de lisosomas. Los experimentos de colocalización de Fn exógena con el marcador molecular de membrana lisosomal (LAMP1) (Figura 16) y la identificación de agregados de Fn exógena en compartimentos multivesiculares (Figura 17) apoyan la noción de que la última etapa del tránsito intracelular de Fn exógena puede ser un compartimiento lisosomal.

El aumento en la degradación de Fn endógena por los lisosomas produce un aumento del estrés oxidativo celular, posiblemente por la liberación al citosol de Fe redox-activo (Kurz y cols., 2007). En forma similar, observamos que la endocitosis de SBFn indujo un aumento en el componente citosólico de Fe lábil (San Martín y cols., 2008).

Estas evidencias, y nuestros datos que muestran la presencia de Fn agregada exógenamente en compartimentos lisosomales, indican que, después de la degradación lisosomal, el Fe presente en Fn exógena está disponible para las funciones celulares y, en el caso específico de las células intestinales, para transporte basolateral e incorporación a la circulación sanguínea.

A inicios del siglo XXI, la deficiencia de Fe sigue siendo un problema de gran importancia en la infancia así como en mujeres menstruantes y embarazadas, donde la frecuencia promedio de la deficiencia de Fe es estimada en 43 %, alcanzando 85 % en algunas poblaciones (Kapur y cols., 2002). La deficiencia de Fe no solo afecta la salud en general sino que también el desarrollo cognitivo (Savoie y Rioux, 2002.). Los regimenes actuales de suplementos de Fe, algunos conocidos por siglos, pueden tener consecuencias negativas y efectos colaterales derivados del daño oxidativo de la química del Fe y el oxígeno (Casanueva y cols., 2003; Makrides y cols., 2003). Nuevas formas de suplementación de Fe son necesarias, particularmente para grupos vulnerables tales como niños y mujeres menstruantes y embarazadas (Beard y cols., 1996, 2000; Casanueva y cols, 2003). Recientes estudios (Murray-Kolb y cols., 2003) confirma estudios anteriores (Sayers y cols., 1973), señalando que poroto de soya (y otros alimentos ricos en Fn) tiene un potencial para ser un nuevo suplemento de Fe que minimiza la deficiencia del Fe dietario. (Lynch y cols., 1985; Theil, 2003). La suplementación dietaria de Fe utilizando Fn puede entonces ser un procedimiento alternativo a la suplementación usando Fe inorgánico. La absorción de Fe mediante la endocitosis de Fn es comparable en magnitud a los otros sistemas de absorción intestinal de Fe. Por ejemplo, la endocitosis de una molécula de SBFn conteniendo 450 átomos de

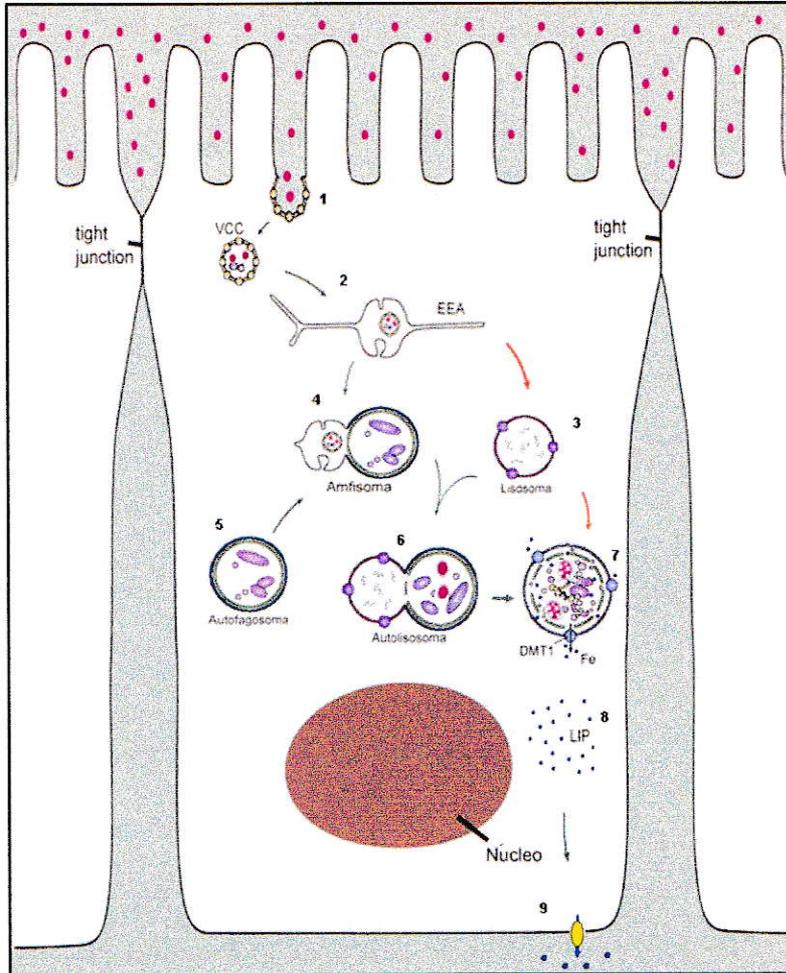
Fe daría una velocidad de incorporación celular de 58 pmoles Fe/h/mg proteína (San Martín y cols., 2008), un valor comparable a incorporaciones de 30 y 108 pmoles Fe/h/mg proteína para Fe inorgánico y Fe hémico en células Caco-2 (Arredondo y cols., 2001; Mendiburo y cols, 2006).

En ponderación, debemos indicar que la posibilidad de que *in vivo* Fn exógena sea absorbida intacta en el intestino, y no sea degradada por enzimas pancreáticas, es aun incierta. Sin embargo, debido a que Fn es una proteína muy estable (Theil, 2003) y el Fe de Fn puede ser absorbido desde SBFn en la presencia de fitatos, que inhiben la absorción de Fe inorgánico (Murray-Kolb y cols., 2003), es posible pensar que el mecanismo de absorción de Fe ferritínico difiere de los usados para transportar complejos de Fe inorgánico.

## 5. CONCLUSIONES

Utilizando células Caco-2 crecidas en insertos bicamerales como modelo de epitelio intestinal, en la presente tesis se describieron los compartimentos celulares por los cuales Fn exógena transita previo a su degradación, lográndose determinar la localización subcelular de Fn exógena en compartimentos característicos de la ruta endocítica degradativa. Observamos que el proceso endocítico de Fn exógena comienza con su endocitosis apical mediante invaginaciones y vesículas cubiertas por clatrina. Esta observación sugiere la existencia de un receptor específico para Fn en la membrana apical de células Caco-2. Proponemos que el tránsito vesicular de Fn exógena continúa secuencialmente por compartimientos endosomales tempranos, compartimientos autofágicos y finalmente compartimientos lisosomales. Sin embargo, una ruta directa desde endosoma temprano a lisosoma no puede ser descartada. La figura 17 esquematiza la posible ruta mediante la cual Fn exógena es endocitada y finalmente degradada por enterocitos.

En resumen, el proceso endocítico de Fn exógena evidenciado en esta tesis aparece ser una forma de absorción de Fe dietario diferente al sistema de absorción de Fe-hem y Fe inorgánico. Este descubrimiento podría formar la base para una nueva estrategia de suplementación de Fe basada en la ingesta de preparados ricos en Fn. Queda por definir si esta nueva ruta es regulada por los niveles de Fe celular, como es la ruta de absorción de Fe inorgánico, o es una ruta constitutiva como parece ser la absorción intestinal de Fe-hem.



**Figura 18. Modelo propuesto para la endocitosis de Ferritina (Fn) exógena.** Fn

exógena (bolas rojas) entra la célula del epitelio intestinal por endocitosis apical a través de invaginaciones cubiertas por clatrina (1), transitando luego por compartimentos endosomales apicales tempranos (EEA) (2) y alcanzando posteriormente el compartimento lisosomal (3) en donde es degradada y el Fe liberado. Paralelamente, el EEA, o un cuerpo multivesicular derivado del EEA, se fusiona con un autofagosoma (5) formando un amfiosoma (4) el que se fusiona posteriormente con un lisosoma formando un autolisosoma (6). Finalmente, Fn exógena es degradada en lisosomas secundarios (7). El Fe es transportado hacia el citosol en donde pasa a formar parte del LIP (8). Desde el LIP el Fe es transportado hacia el medio basolateral por el transportador Ferroportina (9). **LIP:** componente citosólico de Fe lábil. **VCC:** vesícula cubierta por clatrina. **EEA:** endosoma apical temprano. **DMT1:** Transportador de metales divalentes.

## 6. REFERENCIAS

**Adams P. C.** and Chau L. A. (1990). Hepatic ferritin uptake and hepatic iron. *Hepatology*. 11: 805-808.

**Adams P. C.**, Powell L. W. and Halliday J. W. (1988). Isolation of a human hepatic ferritin receptor. *Hepatology*. 8: 719-721.

**Arredondo M.**, Muñoz P., Mura C. V. and Núñez M. T. (2001). HFE inhibits apical iron uptake by intestinal epithelial (Caco-2) cells. *FASEB J*. 15: 1276-1278.

**Arturson P.**, Palm K. and Luthman K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 46: 27-43.

**Beard J.L.** (2000). Effectiveness and strategies of iron supplementation during pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1288–1294.

**Beard J. L.**, Burton J. W. and Theil E. C. (1996). Purified ferritin and soybean meal can be sources of iron for treating iron deficiency in rats. *J Nutr.* 126: 154-160.

**Casanueva E.** and Viteri FE. (2003). Iron and oxidative stress in pregnancy. *J. Nutr.* 133: 1700-1708.

**Chen T.**, Li L., Chung D. H., Allen C., Torti S., Torti F., Cyster J., Chen C. Y., Brodsky F., Niemi E., Nakamura M., Seaman W. and Daws M. (2005). TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *JEM*. 202: 955-965.

**Chung J.** and Wessling-Resnick, M. (2003). Molecular Mechanisms and Regulation of Iron Transport. *Critical Rev Clin Lab Sci*. 40: 151-182.

**Clydesdale F. M.** (1983). Physiochemical determinants of iron bioavailability. *Food Technol*. 3: 133-138.

**Conrad M.**, Burton B., Williams H. and Foy A. (1967). Human absorption of hemoglobin-iron. *Gastroenterol*. 53: 5-10.

**De Domenico I.**, Vaughn M., Li L., Bagley D., Musci G., Ward D. M. and Kaplan J. (2006). Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *EMBO J*. 25: 5396–5404.

**Disler P. B.**, Lynch S. R., Charlton R. W., Torrance J. D. and Bothwell T. H. (1975). The effect of tea on iron absorption. *Gut*. 16: 193-200.

**Donovan A.**, Brownlie A., Zhou Y., Shepard J., Pratt S.J., Moynihan J., Paw B.H., Drejer A., Barut B., Zapata A., Law T.C., Brugnara C., Lux S.E., Pinkus G.S., Pinkus J.L., Kingsley P.D., Palis J., Fleming M.D., Andrews N.C. and Zon L.I. (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nat*. 403: 776–781.

**Finn P.F.**, Mesires N.T., Vine M. and Dice J.F. (2005). Effects of small molecules on chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*. 1: 141-145.

**Fogh J.**, Fogh J.M. and Orfeo T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59: 221-226.

**Forth W.**, and Rummel W. Iron absorption. (1973). *Physiol Rev.* 53: 724-92.

**Garner B.**, Roberg K. and Brunk U.T. (1998). Endogenous ferritin protects cells with iron-laden lysosomes against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 29: 103–114.

**Garner B.**, Li W., Roberg K. and Brunk U.T. (1997). On the cytoprotective role of ferritin in macrophages and its ability to enhance lysosomal stability. *Free Radic. Res.* 27: 487–500.

**Gelvan D.**, Fibach E., Meyron-Holtz E. G. and Konijn A. M. (1996). Ferritin uptake by human erythroid precursors is a regulated iron uptake pathway. *Blood*. 88: 3200-3207.

**Gordon P. B.** and Seglen P. O. (1988). Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 40–47.

**Gruenberg J.** and Maxfield F.R. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 552-63.

**Gunshin H.**, Mackenzie B., Berger U. V., Gunshin Y., Romero M. F., Boron W. F., Nussberger S., Gollan J. L. and Hediger M. A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nat.* 388: 482-488.

**Harrison P. M.** and Arisio P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1275:161-203.

**Hultcrantz R.** and Glaumann H. (1987). Intracellular fate of ferritin in HeLa cells following microinjection. *Exp Cell Res.* 171: 203-212.

**Hulet S. W.**, Powers S. and Connor J. R. (1999). Distribution of transferrin and ferritin binding in normal and multiple sclerotic human brains. *J. Neurol. Sci.* 165: 48-55.

**Hunt J. R.**, and Roughead Z. K. (1999). Nonheme-iron absorption, fecal ferritin excretion, and blood indexes of iron status in women consuming controlled lactoovo-vegetarian diets for 8 wk. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 944-952.

**Kapur D.**, Agarwal K.N. and Agarwal D.K. (2002). Nutritional anemia and its control. *Indian J. Pediatr.* 69: 607–616.

**Klionsky D.** (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Mol. Cell Biol. Rev.* 8: 931-937.

**Kurz T.**, Terman A. and Brunk U.T. (2007). Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch. Biochem. Biophys.* 462: 220-230.

**Layrisse M.**, Martinez-Torres C., Renzy M. and Leets I. (1975). Ferritin iron absorption in man. *Blood*. 45: 689-698.

**Lemmon S.K.**, and Traub L.M. (2000). Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 457–466.

**Levine B.** and Yuan J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* 115: 2679–2688.

**Liao Q. K.**, Kong P. A., Gao J., Li F. Y. and Qian Z. M. (2001). Expression of ferritin receptor in placental microvilli membrane in pregnant women with different iron status at mid-term gestation. *Eur. J. Clin. Nutr.* 55: 651-656.

**Liou W.**, Geuze H. J., Geelen M. J. H. and Slot J. W. (1997). The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J. Cell Biol.* 136: 61–70.

**Lucca P.**, Hurrell R. and Potrykus I. (2002). Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *J. Am. Coll. Nutr.* 21: 184-190.

**Lynch S. R.**, Dassenko S. A., Morck T. A., Beard J. L. and Cook J. D. (1985). Soy protein products and heme iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 41: 13-20.

**Majeski A.E.** and Dice J.F. (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 2435–2444.

**Mahraoui L.**, Ruosset M., Dussaulx E., Darmoul A., Zweibaun A. and Brot-Laroche E. (1992). Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine, and colon. *Am. J. Physiol.* 263: 312-318.

**Maiuri C.**, Zalckvar E., Kimchi A. and Kroemer G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 741–752.

**Makrides M.**, Crowther C.A., Gibson R.A., Gibson R.S. and Skeaff C.M. (2003). Efficacy and tolerability of low-dose iron supplements during pregnancy: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 78:145– 153.

**Martínez-Torres C.**, Romano E. and Layrisse M. (1981). Effect of cysteine on iron absorption in man. *Am J Clin Nutr.* 34: 322-327.

**Massey A.**, Kiffin R. and Cuervo A.M. (2004) Pathophysiology of chaperonemediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 2420–2434.

**McCance R. A.**, Edgecomb C. N. and Widdowson E. M. (1943). Phytic acid and iron absorption. *Lancet.* 2: 126-128.

**McKie A. T.**, Barrow D., Latunde-Dada G. O., Rolfs A., Sager G., Mudaly E., Mudaly M., Richardson C., Barlow D., Bomford A., Peters T. J., Raja K. B., SShirali S., Hediger M. A., Farzaneh F. and Simpson R. J. (2001). An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron. *Science.* 291: 1755- 1759.

**Mendiburo M. J.**, Flores S., Pizarro F. and Arredondo M. (2006) Heme oxygenase 1 overexpression increases iron fluxes in Caco-2 cells. *Biol. Res.* 39: 195-197.

**Mizushima N.** (2004). Methods for monitoring autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 2491-2502.

**Mortimore G.E.** and Pösö A.R. (1987). Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu. Rev. Nutr.* 7:539-564.

**Mu F.T.**, Callaghan J.M., Steele-Mortimer O., Stenmark H., Parton R.G., Campbell C.P., McCluskey J., Yeo J.P., Tock E.P., Toh B.H. (1995). EEA1, an early endosome-associated protein is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J. Biol. Chem.* 270:13503-13511.

**Murray-Kolb L. E.**, Welch R., Theil E. C. and Beard J. L. (2003). Women with low iron stores absorb iron from soybeans. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 180-184.

**Noda T.**, Suzuki K. and Ohsumi Y. (2002) Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol.* 12: 231–235.

**Oates P.S.** and West A.R. (2006). Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World J. Gastroenterol.* 12: 4281–4295.

**Pizarro F.**, Olivares M., Chadud P. and Stekel A. (1988). Efecto del té y de la canela sobre la absorción de Fe no hemínico. *Rev. Chil. Nutr.* 16: 318-323.

**Ramm G. A.**, Britton R. S., O'Neill R. and Bacon B. R. (1994). Identification and characterization of a receptor for tissue ferritin on activated rat lipocytes. *J. Clin. Invest.* 94: 9-15.

**Reggiori F.** and Klionsky D.J. (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot. Cell.* 1:11–21.

**Rucker P.**, Torti F. M. and Torti S. V. (1996) Role of H and L subunits in mouse ferritin. *J. Biol. Chem.* 271: 33352-33357.

**Savoie N.**, and Rioux F.M. (2002). Impact of maternal anemia on the infant's iron status at 9 months of age. *Can. J. Public Health.* 93:203–207.

**Sayers M. H.**, Lynch S. R., Jacobs P., Charlton R. W., Bothwell T. H., Walker R. B. and Mayet F. (1973). The effects of ascorbic acid supplementation on the absorption of iron in maize, wheat and soy. *Br. J. Haematol.* 24: 209-218.

**Seglen P. O.** and Gordon P. B. (1982). 3-methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 79: 1889–1892.

**San Martin C.D.**, Garri C., Pizarro F., Walter T., Theil EC., and Núñez M.T. (2008). Intestinal epithelia (Caco-2) cells absorb soybean ferritin by clathrin-dependent endocytosis. *J. Nutr.* 138: 659–666.

**Shurety W.**, Bright N A. and Luzio J. P. (1996). The effects of cytochalasin D and phorbol myristate acetate on the apical endocytosis of ricin in polarised Caco-2 cells. *J. Cell Sci.* 109: 2927-2935.

**Smith M.**, Omid Y. and Gumbleton M. (2007). Primary porcine brain microvascular endothelial cells: Biochemical and functional characterisation as a model for drug transport and targeting. *J. Drug Target.* 15: 253–268.

**Stromhaug P. E.**, Berg T.O., Fengsrud M. and Seglen P. O. (1998). Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes. *Biochem. J.* 335: 217-224.

**Stromhaug P. E.** and Seglen P. O. (1993). Evidence for acidity of prelysosomal autophagic/endocytic vacuoles (amphisomes). *Biochem. J.* 291: 115–121.

**Suzuki K.**, Kirisako T., Kamada Y., Mizushima N., Noda T. and Ohsumi Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* 20: 5971–5981.

**Theil E. C.** (2004). Iron, Ferritin, and Nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 24: 327-43.

**Theil E. C.** (2003). Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism. *J. Nutr.* 133: 1549-1553.

**Theil E. C.** (1990). The ferritin family of iron storage proteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 63: 421-449.

**Torgersen M. L.**, Skretting G., van Deurs B. and Sandvig K. (2001). Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J. Cell Sci*, 114: 3737-3747.

**Vincent R.A. Jr** and Spicer S.S. (1981). Giant dense bodies in fibroblasts cultured from beige mice with the Chédiak-Higashi syndrome. *Am. J. Pathol.* 105: 27027-27028.

**Wang C-W.**, and Klionsky D.J. (2003). The molecular mechanism of autophagy. *Mol. Med.* 9: 65–76.

**Yorimitsu, T.** and Klionsky D. J. (2007). Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy. *Trends Cell Biol.* 17: 279–285.

## 7. REFERENCIAS WEBSITE

High Resolution Electron Microscopy.

[www.electron.nci.nih.gov/html/research4.html](http://www.electron.nci.nih.gov/html/research4.html)

U. S. National Library of Medicine. Genetic Home Reference.

[www.ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/ferritin](http://www.ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/ferritin)