

UCH-FC
Biotecnología
M534
C.I



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**“CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN CELULAR DE
HEPCIDINA, HORMONA REGULADORA DEL
METABOLISMO DEL HIERRO”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

NATALIA PAZ MENA JIMÉNEZ

Dr. Marco Tulio Núñez González
Director de seminario de Título

Octubre, 2011
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Natalia Paz Mena Jiménez**,

“Caracterización de la función celular de Hecpidina, Hormona Reguladora Del Metabolismo Del Hierro”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Marco Tulio Núñez
Director Seminario de Título

Handwritten signature of Marco Tulio Núñez in blue ink, positioned above a dotted line.

Comisión de Evaluación

Dra. Ana Preller
Presidente comisión

Handwritten signature of Ana Preller in blue ink, positioned above a dotted line. To the right of the signature is a circular stamp that reads "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL", and "U. DE CHILE".

Dra. Verónica Palma
Evaluador

Handwritten signature of Verónica Palma in blue ink, positioned above a dotted line.

Santiago de Chile, Octubre 2011.



Dedicada a Raúl y Francisca



Mi nombre es Natalia Mena, nací en Santiago el 9 de Julio del año 1981. Mis estudios de básica y media los realicé en el colegio Divina Pastora y en El San Marcos, en este último en tercero medio fue cuando decidí ser científica. En el año 2000 entre a estudiar ingeniería en Biotecnología en la Facultad de ciencias de la Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS



Primero que todo quisiera agradecer al Doctor Marco Tulio Núñez por el enorme apoyo y confianza que tuvo en mí, por darme la oportunidad siempre de realizar mis ideas y creer en ellas. Y por la gran sabiduría con la que ha guiado mi formación científica.

Agradezco a los integrantes del laboratorio del doctor Marco Tulio Núñez, a todos los que desde el principio estuvieron conmigo, siendo parte esencial en la realización de esta tesis: Alejandro Rojas, Victoria Tapia, Pabla Aguirre, Pablo Muñoz, Dora Mazariegos, Patricia Muñoz, Claudia Núñez, Viviana Gallardo, Raúl Araya, Andrés Esparza, Nicole Diemer, Carolina Carriel, Carolina Garri, Carol San Martín, Pamela Valdés, Daniela Sandoval, Pamela Urrutia, Daniel Borquez, Francisco Gómez y Carlos Fuentealba.

Gracias a mis mejores amigos el Cato (Alejandro Rojas) y la Tuti (Susana Valenzuela), eternos amigos de vida y estudio. Y a las bellas familias que tienen.

A mis grandes amigos de carrera: el Richi, Caroca, Felipe, Nacho, Marcos, Dani y Pilar por su amistad.

A mis padres Raúl Mena y Eugenia Jiménez por su incondicional amor, apoyo y enorme dedicación. A mis hermanos Raúl y Francisca por su inmenso amor y por lo mucho que me han enseñado.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| IX. RESUMEN..... | 1 |
| II. ABSTRACT..... | 3 |
| III. INTRODUCCIÓN..... | 4 |
| 3.1 Importancia y toxicidad del hierro..... | 4 |
| 3.2 Homeostasis celular del hierro..... | 6 |
| 3.3 Mecanismo general de la absorción del hierro..... | 7 |
| 3.4 Rol de hepcidina en el metabolismo del hierro..... | 8 |
| IV HIPÓTESIS..... | 14 |
| V OBJETIVOS..... | 14 |
| 5.1 Objetivo general..... | 14 |
| 5.2 Objetivos específicos..... | 14 |
| VI MATERIALES..... | 15 |
| 6.1 Material biológico..... | 15 |
| 6.2 Reactivos generales..... | 16 |
| 6.3 Anticuerpos..... | 16 |
| 6.4 Radioisótopos..... | 18 |
| 6.5 Biología molecular..... | 18 |
| 6.6 Equipos..... | 18 |
| 6.7 Otros..... | 18 |

| | | |
|-------------|---|----|
| VII | MÉTODOS | 19 |
| 7.1 | Cultivos celulares..... | 19 |
| 7.2 | Clonación del cADN total de Hepsidina..... | 19 |
| 7.3 | Transfecciones celulares: obtención de un medio condicionado rico en hepcidina..... | 20 |
| 7.4 | Remoción de hepcidina desde el medio condicionado mediante el uso de anticuerpo..... | 21 |
| 7.5 | Análisis por RT-PCR..... | 22 |
| 7.6 | Experimentos de transporte de hierro radioactivo (⁵⁵ Fe) en insertos bicamerales de células caco-2..... | 22 |
| 7.7 | Incorporación de hierro radioactivo (⁵⁵ Fe) en duodeno de rata..... | 23 |
| 7.8 | Extractos celulares y análisis mediante western blot..... | 24 |
| 7.9 | Inmunocitoquímica..... | 25 |
| 7.10 | Biotinilación..... | 25 |
| VIII | RESULTADOS | 27 |
| 8.1. | Producción de hepcidina por las células de hepatoma humano HepG2..... | 27 |
| 8.2. | Distribución de hepcidina en células caco-2..... | 28 |
| 8.3. | Hepsidina disminuye la incorporación apical de hierro en células caco-2 y en duodeno de rata..... | 31 |
| 8.4. | Expresión de la cantidad de proteína y ARN mensajero para DMT-1 y ferroportina..... | 34 |
| 8.5. | Hepsidina inhibe la expresión de DMT-1, pero no de ferroportina en células caco-2 y en duodeno de rata..... | 36 |
| 8.6. | Análisis de inmuno-fluorescencia de DMT-1 y ferroportina en células caco-2..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 8.7. Efecto de hepcidina sobre la distribución de ferroportina en la membrana de células caco-2 y macrófagos J774..... | 39 |
| IX. DISCUSIÓN..... | 41 |
| X. CONCLUSIONES..... | 44 |
| XI. REFERENCIAS..... | 45 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo general de la absorción de hierro
- Figura 2.** Mecanismo de acción de hepcidina
- Figura 3.** Secuencia aminoacídica y modelo estructural de hepcidina
- Figura 4.** Producción de hepcidina por células HepG2
- Figura 5.** Localización subcelular de hepcidina en células caco-2
- Figura 6.** Hepcidina inhibe la incorporación de hierro en células caco-2 y en duodeno de rata
- Figura 7.** Efecto de hepcidina sobre los ARN mensajeros de los transportadores DMT-1 y ferroportina en células caco-2
- Figura 8.** Hepcidina inhibe la expresión de DMT-1, pero no de ferroportina en células caco-2 y duodeno de rata
- Figura 9.** Análisis de inmunofluorescencia de DMT-1 y ferroportina en células caco-2
- Figura 10.** Efecto de hepcidina sobre los niveles de ferroportina

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------------|---|
| ADN | Ácido desoxiribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxiribonucleico complementario 10 |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| BSA | Albúmina sérica de bovino |
| Dcytb | Ferrireductasa |
| DMEM | Medio Mínimo Esencial Dulbecco |
| DMT-1 | Transportador de metales divalentes 1 |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetracético |
| Fe | Hierro |
| FP | Transportador basolateral de hierro, ferroportina |
| Ft | Ferritina citosólica |
| Hepc | Hepcidina |
| HepG2 | Línea celular de hepatoma humano |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| J774 | Línea celular de macrófago |
| LIP | Pool de hierro lábil |
| Medio-Hepc | Medio condicionado rico en hepcidina |
| NTA | Ácido nitrilotricético |
| O ₂ ^{·-} | Radical superóxido |
| OH [·] | Radical hidroxilo |
| PBS | Solución tampón de fosfato salino |

| | |
|-------------|---|
| pCDNA3 | Plasmidio pCDNA3 |
| pCDNA3-Hepc | Plasmidio pCDNA3 en el que se encuentra clonada hepcidina |
| pCDNA3-i | Plasmidio pCDNA3, en el que se encuentra clonada hepcidina con una mutación puntual |
| ROS | Especies reactivas del oxígeno |
| SD | Desviación estándar |
| SFB | Suero Fetal de Bovino |
| SH-SY5Y | Línea celular de neuroblastoma humano |
| Tf | Transferrina |
| TfR | Receptor de transferrina |

IX. RESUMEN

Hepcidina (Hepc) es un péptido catiónico de 25 aminoácidos, con una amplia acción antibacteriana y antifúngica. En mamíferos se expresa predominantemente en el hígado, desde donde es secretada a la sangre. Hepc ha sido postulada como el "Regulador Central" de la homeostasis corporal del hierro (Fe). En este trabajo caracterizamos el efecto de Hepc sobre la expresión de transportadores de Fe en modelos de células intestinales. Con el objetivo de obtener un medio de cultivo con una alta actividad de Hepc, ésta fue clonada y sobre expresada en células HepG2 (línea celular de hepatoma humano, en la cual Hepc es liberada al medio extracelular). Posteriormente, células caco-2, modelo celular de intestino, fueron expuestas a este medio condicionado rico en Hepc, produciéndose su incorporación. Hepc incorporada fue destinada a un compartimiento citoplasmático identificado como el retículo endoplasmático. El cultivo de células caco-2 o duodeno de rata expuestos al medio condicionado, dio como resultado una fuerte inhibición en la incorporación apical de Fe, sin efectos en su transporte basolateral. Consecuentemente, en células caco-2 los niveles de proteína y de RNA mensajero de DMT-1, el transportador apical de Fe disminuyó, mientras que el del transportador baso-lateral ferroportina, no fueron modificados. Adicionalmente, se estudio el efecto de Hepc en macrófagos. Se observó que en macrófagos Hepc no modificó la expresión de DMT-1, en tanto que indujo una disminución temporal de los niveles de ferroportina. Sobre la base de estos resultados, planteamos que el efecto de Hepc es célula-específico. Los datos apoyan un mecanismo en el cual, Hepc circulante secretada por el hígado entra al

enterocito e inhibe la transcripción de DMT-1, regulando de este modo la incorporación de Fe desde el lumen intestinal a la circulación sanguínea.

II. ABSTRACT

Hepcidin (Hepc) is a 25 amino acid cationic peptide with broad antibacterial and antifungal actions. In mammals, Hepc is predominantly expressed in liver from where it is secreted to the blood. Hepc has been postulated as the "store regulator", a putative factor that regulates body iron (Fe) content. In this work, we characterized the effects of Hepc on Fe absorption by intestinal cells. In order to obtain a culture medium with high Hepc activity, human Hepc was cloned and over expressed in HepG2 cells (cellular line of human hepatoma from Hepc is released to the extracellular medium). Next, caco-2 cells were exposed to conditioned medium rich in Hepc. Hepc was taken up and destined to the cytoplasmic compartment identified as endoplasmic reticulum. Culture of caco-2 cells or rat duodenal explants with Hepc enriched medium resulted in strong inhibition of apical Fe uptake without apparent effects on the transfer of Fe from the cells to the basolateral transport. Concurrently, the levels of DMT-1 protein and mRNA decreased whereas the protein and mRNA levels of the basolateral Fe exit transporter ferroportin did not change. Additionally, we studied the effects on the Fe transporter in macrophages. We observed that Hepc did not alter DMT-1 expression while decreasing ferroportin protein levels. Based on these results, we propose that the Hepc effect is cell-specific. These data support a model in which circulating Hepc secreted by the liver enters to the enterocyte and inhibits DMT-1 transcription and Fe incorporation from intestinal lumen to the blood.

III. INTRODUCCION

3.1 Importancia y toxicidad del hierro

El hierro (Fe) es un elemento esencial para la vida, participa en una serie de procesos de oxido-reducción vitales para el funcionamiento celular. Transporta electrones en la cadena respiratoria, es parte estructural de proteínas (aconitasas, catalasas, peroxidadasas y oxigenasa), regula la transcripción génica y participa en el transporte de oxígeno (Aisen y col., 2001; Beinert y Kiley, 1999; Rytter y Tyrrell, 2000; Wang y Pantopoulos, 2011).

La propiedad química que le permite al Fe llevar a cabo estas funciones biológicas es su capacidad de variar su potencial de reducción según los ligandos a él coordinados. Esta propiedad lo vuelve un cofactor versátil en los procesos de intercambio de electrones, en los que alterna entre sus formas reducida (Fe^{+2}) y oxidada (Fe^{+3}).

Paradójicamente esta misma propiedad de intercambiar entre dador y aceptor de electrones lo vuelve un elemento altamente tóxico. Cuando uno o más de sus seis sitios de coordinación no se encuentran ligados con alta afinidad, o cuando se encuentra en exceso, éste se convierte en un elemento redox-activo no regulado, produciendo el radical libre superóxido al reaccionar con oxígeno e hidroxilo al reaccionar con peróxido de hidrógeno, reacciones conocidas como Haber-Weiss y Fenton, respectivamente (Droge, 2002; Takami y Sakaida, 2011). En particular, el radical libre hidroxilo es una especie altamente reactiva, que promueve la oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos y transversión de bases en los

ácidos nucleicos (Andrews y Levy, 1998; Sofic y col., 1988). Por este motivo el contenido celular de Fe es mantenido entre límites muy estrechos, conservándose a concentraciones suficientes para la síntesis de metaloproteínas esenciales, pero evitando los posibles efectos tóxicos derivados de su sobrecarga.

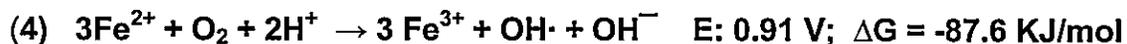
Reacciones de Haber-Weiss (1) y Fenton (3):



Adicionalmente, en presencia de H_2O_2 el Fe^{2+} es un catalizador de la producción de OH^{\cdot}



Estas tres reacciones conforman la base de la relación Fe/ROS en ambientes intracelulares. Su acoplamiento resulta en la reacción 4, (la cual es altamente favorable) que establece la relación entre el Fe y el oxígeno:



La forma oxidada del Fe (Fe^{3+}) producto de las reacciones (1) y (3) puede ser nuevamente reducido por reductores celulares, como ascorbato y glutatión (GSH), agentes protectores de la producción de radicales libres.

Algunas investigaciones han demostrado que los sistemas reguladores funcionan adecuadamente en condiciones de carencia del metal, pero fallan cuando éste se encuentra en exceso (Nunez-Millacura y col., 2002).

3.2 Homeostasis celular del hierro

En biología celular no es posible presentar un modelo general de la homeostasis celular del Fe, ya que diferentes tejidos, con funciones distintas, presentan variaciones en su regulación. Así, las células hepáticas incorporan Fe almacenándolo, las células intestinales lo absorben y transfieren a la circulación sanguínea, las células hematopoyéticas lo almacenan para la formación de hemoglobina, y los macrófagos lo reciclan desde glóbulos rojos senescentes y liberan a la circulación sanguínea según señales sistémicas.

En este trabajo se utilizaron dos modelos celulares. El primero, la línea de carcinoma de colon humano, diferenciada a epitelio intestinal, caco-2 (Alvarez-Hernandez y col., 1991; Garcia y col., 1996) y el segundo, la línea de macrófago J774 (Snyderman y col., 1977).

Las células caco-2 son utilizadas como modelo de la absorción intestinal de Fe. En cultivo se polarizan y desarrollan junturas estrechas que sellan los espacios intracelulares generados durante el proceso de diferenciación. De este modo, es posible definir dos superficies, la apical extrapolable al lumen intestinal y la baso lateral, extrapolable a la sección intestinal expuesta al plasma sanguíneo (Peterson y col., 1993).

El grado de unión entre estas células puede ser cuantificado por medición de la resistencia eléctrica que existe a través del epitelio artificial generado. Así, en los insertos, las células crecen y se diferencian, encontrándose expuestas a medios diferentes dependientes de su superficie.

La línea de macrófagos J774 fue utilizada para un estudio comparativo sobre el mecanismo de acción de Hpc, entre estas células (línea de macrófagos) y las del epitelio intestinal.

3.3 Mecanismo general de la absorción de hierro

En el lado apical del enterocito (correspondiente al lumen intestinal), el Fe^{3+} es reducido por la ferrireductasa Dcytb, una proteína ubicada en la membrana apical. Una vez ocurrido esto, el Fe es incorporado mediante el transportador de metales divalentes DMT-1, también conocido como DCT1 o Nramp2 (Canonne-Hergaux y col., 1999; Gunshin y col., 1997).

En el interior celular el Fe puede: (i) formar parte del pool de Fe lábil (LIP), (ii) ser destinado hacia la mitocondria para la síntesis de grupos hem y núcleos Hierro-azufre (Fe-S) o (iii) ser almacenado por la proteína citosólica ferritina (Ft) (Harrison y Arosio, 1996).

Finalmente, en la superficie baso lateral se encuentra ferroportina (FP), proteína que transporta el Fe desde el enterocito a la circulación sanguínea, (Figura 1).

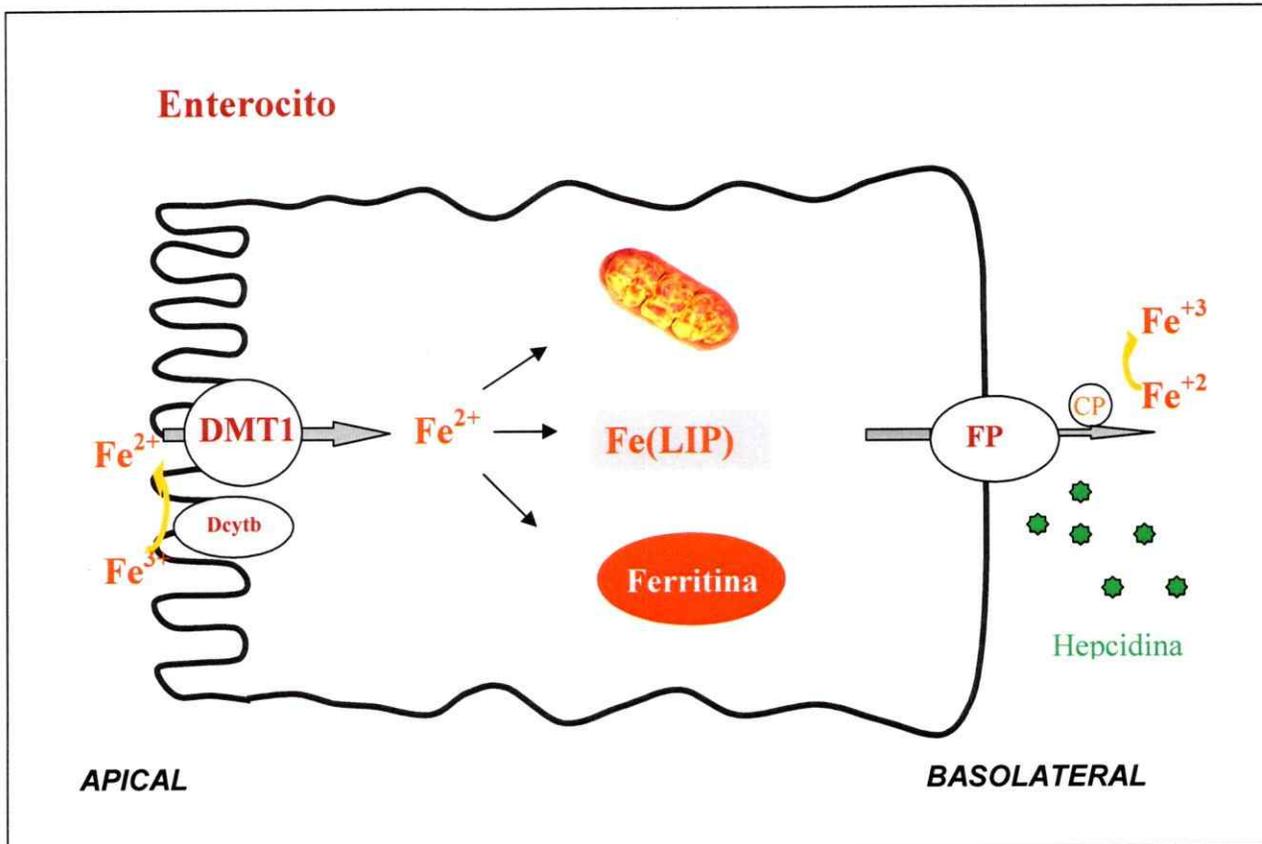


Figura 1. Mecanismo general de la absorción intestinal de hierro. El Fe proveniente de los alimentos es inicialmente reducido por la ferrereductasa Dcytb, el Fe reducido es incorporado al citoplasma por el transportador apical DMT-1. Una vez en el interior, el Fe puede formar parte del LIP citosólico, ser almacenado en ferritina, transportado a la mitocondria o abandonar la célula hacia la circulación sanguínea mediante el transportador FP. Hepcidina liberada por el hígado a la circulación sanguínea llega al enterocito donde actúa inhibiendo la absorción del metal.

3.4 Rol de hepcidina en el metabolismo del hierro

A pesar de los grandes avances realizados en la dinámica del metabolismo del Fe, los mecanismos por los cuales el organismo regula su absorción intestinal no están claros.

Hepcidina (Hepc), también denominada como LEAP-1 (Krause y col., 2000), ha sido propuesta como el "Regulador Central", un factor que señala a las células del intestino el contenido de Fe corporal, determinando así la cantidad de Fe que

éstas deben absorber (Nicolas y col., 2001; Pigeon y col., 2001) (Figura 1). Hpc es producida por el hígado como un pro-péptido de 84 aminoácidos, el que posteriormente sufre un procesamiento post-transcripcional, en el cual es digerido, produciéndose 3 isoformas, de 20, 22 y 25 aminoácidos (Krause y col., 2000). De las tres solo la correspondiente a 25 aminoácidos se ha descrito como funcional (Figura 2).

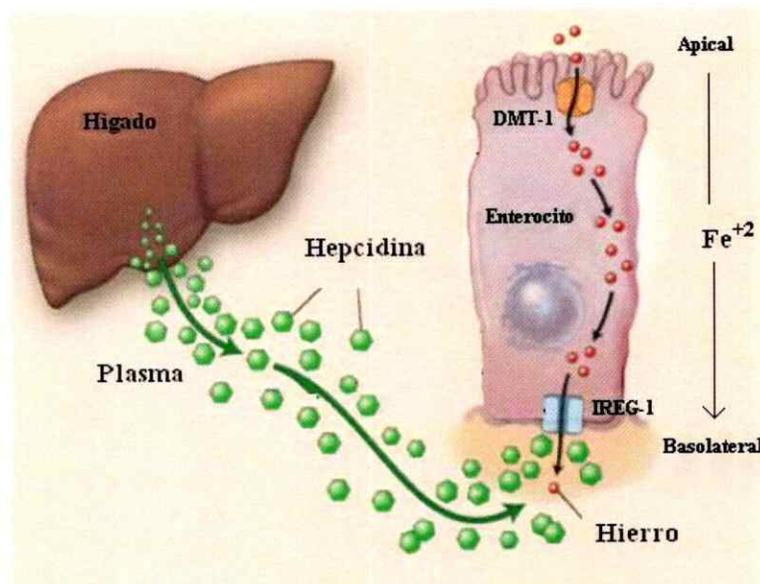


Figura 2. Mecanismo de acción de hepcidina. Cuando aumentan los niveles de Fe corporal, Hpc es liberada por el hígado hacia la circulación sanguínea. Hpc llega a los enterocitos, bloqueando en este lugar la entrada de Fe al organismo.

El péptido maduro de Hpc contiene 8 residuos de cisteínas que forman 4 puentes disulfuro, (Figura 3) (Pigeon y col., 2001). Este inusual alto número de residuos de cisteínas es común en péptidos antimicrobianos, tales como las defensinas (Ganz, 2006), tachiplesinas (Yamaji y col., 2004) y protegrinas (Laftah y col., 2004).

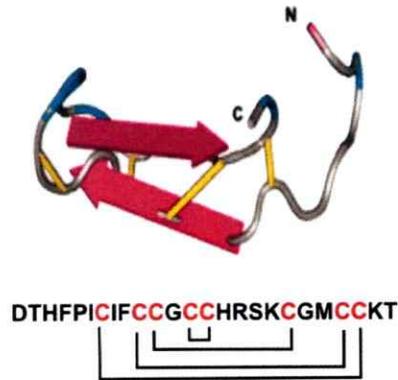


Figura 3. Secuencia aminoacídica y modelo estructural de Hepsidina. La secuencia aminoacídica se representa por el código de una letra, en rojo se destacan las cisteínas. Los extremos amino- y carboxilo-terminales se representan como N y C, respectivamente. El patrón de puentes disulfuro se representa en la secuencia aminoacídica mediante llaves. (Tomado de: Ganz T. Blood 2003;102:783-8).

El primer trabajo que indicó que Heps tendría un rol en la regulaci3n del metabolismo del Fe fue realizado en ratones que presentaban una disrupci3n en un gen que codifica para el factor de transcripci3n USF2, los que desarrollaban una sobrecarga de Fe en hígado y páncreas (Nicolas y col., 2001).

En concordancia con un rol de Heps en el control de la absorci3n de Fe, una sobrecarga de Fe induce una sobre expresi3n de Heps en ratones (Pigeon y col., 2001). Adicionalmente, mutaciones en el gen de Heps fueron reportadas en dos familias con Hemocromatosis juvenil severa, enfermedad caracterizada por un gran aumento en los niveles de Fe sistémico (Kulaksiz y col., 2004).

El mecanismo por el cual Heps regula la absorci3n intestinal del metal aún no esta claro.

Células de epitelio intestinal humano caco-2, expuestas a Heps sintética durante 24 horas, muestran una disminuci3n en la incorporaci3n apical de Fe, esto

acompañado de una baja en los niveles de proteína y de ARN mensajero del transportador apical DMT-1 (Laftah y col., 2003). Otros reportes del mismo grupo mostraron que inyecciones de Heps sintética en ratones, inhiben significativamente la incorporación apical de Fe en el duodeno, sin afectar la transferencia de éste a la sangre (Laftah y col., 2004). En ambos reportes las concentraciones usadas para Heps sintética van entre 10 y 1000 ordenes de magnitud mayor a las reportadas en el suero y orina (Kulaksiz y col., 2004; Park y col., 2001), representando esto un problema en la confiabilidad de los datos obtenidos.

Otro de los problemas presentados al trabajar con Heps sintética, es la pérdida de precisión con que los 4 puentes disulfuros presentes en la estructura del péptido son procesados en el retículo endoplásmico (RE), debido a que existen 105 combinaciones posibles de uniones de grupos disulfuros en la muestra.

A pesar de estas objeciones frente al uso de una Heps sintética, el trabajo de Lafta sugiere fuertemente que Heps inhibe la incorporación apical de Fe.

Otras investigaciones nos entregan datos contradictorios, señalando que inyecciones con LPS (el cual estimula la producción de Heps) induciría un cambio bifásico en el ARN mensajero de FP, el transportador baso lateral de Fe en ratas: una reducción temporal del ARN mensajero de FP a las 12-24 horas, seguido de un incremento a las 48 horas posterior a la inyección (Yeh y col., 2004).

La investigación que apoya un papel para DMT-1 es contrastada por un modelo sobre la regulación de la absorción intestinal de Fe, desarrollado por el grupo de Nemeth (Nemeth y col., 2004) en la línea celular de riñón HEK 293. En este modelo se propone a Heps como el factor causante de una internalización de FP

desde la membrana basolateral de los enterocitos, produciendo luego su posterior degradación. El trabajo de Nemeth tiene la importante limitación del uso de una línea celular no relacionada con el epitelio intestinal. Esto, por que es conocido que la respuesta de los diferentes componentes de la homeostasis corporal del Fe es de carácter célula específica. Es así como podemos mencionar, por ejemplo, que la expresión ectópica de HFE, una proteína relacionada con la hemocromatosis, en células HT29 bloquea la capacidad de exportar Fe, probablemente por una inhibición de la síntesis de hefestina (Davies y Enns, 2004), mientras que la expresión de HFE en las células HeLa (células de colon humanas) y en las células caco-2 inhibe la incorporación de Fe (Arredondo y col., 2001; Roy y col., 1999).

De este modo, el mecanismo celular que relaciona a Hpc y el metabolismo del Fe, y cómo ésta inhibe la absorción del metal, aún no esta claro.

En este trabajo investigamos los efectos de Hpc sobre la expresión de transportadores de Fe, para esto se utilizaron células de hepatoma productoras de Hpc (HepG2). De este modo Hpc humana fue clonada y sobre expresada en las células HepG2, con el objetivo de obtener un medio de cultivo con una alta actividad de Hpc.

El cultivo de células caco-2 y duodeno de rata, expuestos al medio condicionado rico en Hpc, resultó en una fuerte inhibición en la incorporación apical de Fe. Concordantemente, los niveles de proteína y RNA mensajero para DMT-1 también disminuyeron. En cambio, los niveles de proteína y RNA mensajero para FP no mostraron cambios significativos.

Los datos obtenidos en este trabajo proponen un nuevo modelo, en el cual HcpC cumple la función de disminuir los niveles corporales de Fe, mediante la inhibición del transportador apical DMT-1.

IV. HIPÓTESIS

Hepcidina inhibe la expresión del transportador apical de hierro DMT-1, disminuyendo y regulando así la entrada del metal al organismo.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar el blanco de acción de Hpc en las células del enterocito absortivo, con el fin de proponer un modelo que explique la forma en que concentraciones fisiológicas de Hpc regulan la absorción sistémica de Fe.

5.2 Objetivos Específicos

1. – Clonar Hpc en el plasmidio pCDNA3 (pCDNA3-Hpc).
- 2.- Obtención de un medio condicionado rico en Hpc (Medio-Hpc), desde células HepG2, transfectadas con el plasmidio pCDNA3-Hpc.
- 3.- Determinar si las células caco-2 incorporan Hpc proveniente del Medio-Hpc, y si esto es así, qué distribución celular presenta.
- 4.- Determinar mediante el uso de Fe radioactivo (^{55}Fe) el efecto de Hpc en la incorporación de Fe.
- 5.- Determinar el efecto de Hpc a nivel de RNAm y proteína, para los transportadores DMT-1 y FP en células caco-2 y duodeno de rata.

6.- Determinar el efecto de Hepc sobre los transportadores DMT-1 y FP, en la línea celular de macrófago J774.

VI. MATERIALES

6.1 Material Biológico

Línea celular **HepG2** proveniente de un hepatocarcinoma humano, obtenida de American Type Culture Collection (ATCC CCL-131 Número: HB-8065 Rockville, MD).

Línea celular **Caco-2** proveniente de un hepatocarcinoma de colon rectal humano, obtenidas de American Type Culture Collection, (ATCC Número: HTB-37 Rockville, MD).

Línea celular **J774** de macrófago, provenientes de un hibridoma, obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC Número: HB-197, Rockville, MD).

Línea celular **SH-SY5Y**, obtenidas de American Type Culture Collection # CRL-2266, Rockville, MD, correspondiente a un tercer sub clon sucesivo de la línea SK-N-SH, originaria de un cáncer de médula ósea (Encinas y col., 2000).

6.2 Reactivos generales

Acrilamida, bis-acrilamida, azul de bromofenol, azul de tripán, β -mercaptoetanol, agarosa, albúmina de suero bovino (BSA), tampón fosfato salino (PBS), marcador de peso molecular de ADN y proteína, cóctel de inhibidores de proteasa, desferal (DFO), ácido etilén diamino tetra-acético (EDTA), TRIS (Tris hidroximetil aminometano) , tampón salino fosfato (PBS), etanol, isopropanol, glicerol, hepes, cloruro de calcio (CaCl_2), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), ácido clorhídrico (HCl) cloruro de potasio (KCl), metanol, cloruro de magnesio (MgCl_2), acetato de magnesio (MgOAc), cloruro de sodio (NaCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4), fosfato de sodio (NaHPO_2), fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato (NADPH), hidróxido de sodio (NaOH), detergente NP-40, paraformaldehído (PFA), fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), persulfato de amonio (PSA), sacarosa, dodecil sulfato de sodio (SDS), tris tampón salino (TBS), tween-20, temed, tris base, tritón X-100.

6.3 Anticuerpos.

Anticuerpo contra DMT-1: Monoclonal producido en ratón, preparado contra el carboxilo terminal de la isoforma +IRE de DMT-1, el cual fue utilizado como fue descrito previamente en (Arredondo y col., 2001).

Anticuerpo contra FP: Policlonal producido en conejo, correspondiente a la secuencia carboxilo terminal CGPDEKEVTKENQPNTSVV, consenso para humano, rata y ratón, utilizado como se describe en (Arredondo y col., 2001).

Anticuerpo contra Calreticulina: Monoclonal producido en ratón, de Biosciences (San José, CA).

Anticuerpo contra Heps: Policlonal producido en conejo, este fue preparado por inmunización de ratones con el péptido replegado de una Heps sintética de 25 aminoácidos (Bio-Synthesis Inc, Lewisville, TX). La proteína replegada fue obtenida mediante una disolución de Heps sintética a una concentración de 5 mg/mL en Na_2CO_3 0,5 M seguido de una reducción por 16 horas a 52°C con ditioneitol 0.1 M y bisulfito de sodio 0.2 M. Los reactivos fueron separados en una columna de Biogel P-2 equilibrada en tampón carbonato pH. La unión de los puentes disulfuros fue inducida por una incubación durante 24 horas a 37°C de la solución carbonato 0,5 M, EDTA 2 mM, cisteína 3 mM y cistina 0,15 mM. El péptido replegado fue separado de los reactivos por filtración en columnas de Biogel P-2 equilibradas. Después de la elusión, el pH de la solución que contenía el péptido replegado fue ajustado con HCl a pH 7. La concentración del péptido obtenido fue estimada mediante Bradford, usando un péptido estándar comercial. Posteriormente el péptido replegado fue unido a una proteína blue carrier para la preparación de un anticuerpo policlonal. (Biosonda, Santiago, Chile).

El anticuerpo fue purificado por cromatografía de afinidad contra el péptido de Heps.

Anticuerpo secundario Alexa Flúor 488

Alexa fluor 488 y Alexa fluor 594 adquiridos de Invitrogen- Molecular Probes (Carlsbad, CA).

6.4 Radioisótopos

Hierro radioactivo (^{55}Fe), de New England Nuclear, Boston, EEUU.

6.5 Biología Molecular

Enzimas de restricción: Kpn1, BamH1, EcoR1, Apa1, HindIII, Xho1, Not1, AgeI, Xba1, Enzimas CIAP, T4 Ligasa, Taq Polimerasa, transcriptasa reversa, DNAsa I, RNAsa I, LB, agar, agarosa, acrilamida, lipofectamina 2000, Opti MEM, trizol, fenol, cloroformo, oligo nucleótidos (oligo dt).

6.6 Equipos

Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda EZ210, Lector de Elisa Tecan Sunrise Magellan, Termociclador Mini Cycler MJ Research, lector de fluorescencia CytoFluor II Series 4000, centrífuga Sorvall RT6000B, centrífuga tubos 1.5mL Mikro-22R Hettich, microscopio Confocal Carl Zeiss Laser scanning system LSM510.

6.7 Otros

Kit de quimioluminiscencia para análisis de western blot super signal (Pierce Chem. Co., Rockford, IL).

* Los medios de cultivo y reactivos utilizados son de invitrogen-GIBCO Life Technologies (Carlsbad, CA). CNBr-sefarosa activada y tampones son de la compañía Sigma Chem. Co (St. Louis, MO).

VII MÉTODOS

7.1 Cultivos celulares.

Las líneas celulares SH-SY5Y, HepG2, caco-2 y J774, fueron crecidas a 37°C con 5% de CO₂ en medio DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), Hepes 15 mM, aminoácidos no esenciales 10 mM, piruvato de sodio 0,5 mM, bicarbonato de Sodio 5,9 mM, penicilina 10 Unidades / mL, estreptomycin 10 mg/mL y fungizona 250 µg / mL. El medio de cultivo fue cambiado cada 2 días.

7.2 Clonación del cDNA total de hepcidina.

El contenido total de RNA fue extraído de células HepG2 usando el reactivo Trizol (Invitrogen-GIBCO Life Technologies), de acuerdo a instrucciones de manufactura. La reacción de amplificación de transcripción reversa de la polimerasa (RT-PCR) fue realizada usando los siguientes partidores obtenidos del transcrito completo de Hpc humana (Gen Bank data base accession AF N° 309489) cADN: 5´cagacagaattcacgatggcaatgagc3´ (sentido) y 5´caggtagctcgagcgtcttgcagc3´ (reverso). Después de una desnaturación inicial a 94°C durante 3 minutos, la reacción se sometió a 30 ciclos al siguiente programa de temperatura: 94°C por 30

segundos, 61°C por 1 minuto, y 72°C por 30 segundos; este programa fue seguido de unos 5 minutos de un paso de elongación a 72°C.

Los productos amplificados fueron observados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

El cDNA obtenido, fue purificado usando una matriz de sílica en una solución de Ioduro de Sodio (NaI) 6 M y clonado en el plasmidio pCDNA3 (Invitrogen-GIBCO Life Technologies).

También se obtuvo un cDNA de una Hepc inactiva, generado por inserción de una guanina en la posición 194 del marco de lectura abierto. La inserción cambió el marco de lectura en el aminoácido número 65 dando como resultado una Hepc con un dominio carboxilo terminal, traducándose en una forma inactiva (ver resultados). El constructo fue clonado en el plasmidio pCDNA3, denominado pCDNA3-iHepc.

7.3 Transfecciones celulares: obtención de un medio condicionado rico en hepcidina.

Células HepG2 crecidas a una alta densidad (90-95%), en pocillos de 60 mm de diámetro fueron transfectadas transientemente con una mezcla de 8 µg de DNA y 20µL de lipofectamina 2000, en 1 mL de medio sin antibióticos y suero reducido (Opti-MEM, Invitrogen-GIBCO Life Technologies). Luego de 24 horas las células fueron nuevamente transfectadas. Seis horas después de la segunda transfección el medio fue cambiado a DMEM 10% SBF y la incubación continuó por otras 18 horas. Posteriormente, el medio fue colectado y utilizado como medio

condicionado rico en Hepc (Medio-Hepc). Como controles se utilizó medio condicionado obtenido de transfecciones con el plasmidio pCDNA3 original sin el inserto, con el plasmidio pCDNA3-iHepc (Hepc inactiva) o con medio normal sin transfectar.

7.4 Remoción de hepcidina desde el medio condicionado mediante el uso de anticuerpo.

Como control el Medio-Hepc fue tratado con sefarosa unida a anticuerpos contra Hepc, con el objetivo de retirar la Hepc presente en el medio. Para esto el anticuerpo contra Hepc fue purificado por afinidad de absorción contra el péptido inmunogénico unido a sefarosa. Posteriormente, el anticuerpo fue eluido con glicina 0,2 M a pH 2,5. Luego de la neutralización y de una diálisis contra NaHCO₃ 0,5 M, el anticuerpo purificado fue acoplado a sefarosa activada por CNBr, siguiendo las instrucciones del productor.

Una alícuota del Medio-Hepc fue tratada por 16 horas con sefarosa unida a anticuerpos contra Hepc. Experimentos preliminares determinaron la razón óptima entre las concentraciones de anticuerpo y el medio de cultivo.

Posterior a la separación con sefarosa por centrifugación, el medio sin Hepc fue utilizado en experimentos de incorporación Fe radioactivo (⁵⁵Fe), western blot e inmuno citoquímica de células caco-2 y duodeno de rata.

Como control, una alícuota de Medio-Hepc bajo los mismos tratamientos, pero sin tratamiento con anticuerpos fue utilizada.

7.5 Análisis por RT-PCR.

Los análisis de RT-PCR para DMT-1 y FP fueron realizados utilizando los siguientes partidores:

DMT1:

5'CAGCCACTCAGGTACCCACCATGG3' (sentido)

5'CTAATCCAGGGCCCTTTAACGTAGCCACGGG3' (reverso)

FP:

5'CTAATGGGTGTGAAGGACTC3' (sentido)

5'CCAGCCATTTATTGGAATTCTGCAGTAC3' (reverso)

β -actina:

5'CCACACCCGCCGCCAGCTC3'(sentido)

5'ATAGCACAGCCTGGATAGCAACGTACA3' (reverso).

Los análisis de la intensidad de bandas para DMT-1 y FP fueron cuantificados por densitometría y normalizados mediante la expresión de actina.

7.6 Experimentos de transporte de hierro radioactivo (^{55}Fe) en insertos bicamerales de células caco-2.

Para los experimentos de transporte de ^{55}Fe , las células fueron crecidas sobre filtros de carbonato de $0,33\text{ cm}^2$ (Transwells, Corning-Costar, Cambridge, MA). La formación de la mono capa fue monitoreada midiendo eléctricamente la resistencia trans epitelial, con un sistema de resistencia eléctrica de Millicell (Millipore, Bedford, MA). La estabilización de la resistencia tomó entre 7 y 10 días.

Para asegurar la integridad de la barrera celular, la resistencia de los insertos fue medida al inicio y término de cada experimento, descartando aquellos con resistencias menores a $250 \times \Omega \times \text{cm}^2$.

Previo a los ensayos de incorporación de ^{55}Fe , las células fueron incubadas por 24 horas con Medio-Hepc o los medios controles adicionados en el lado basolateral de los insertos, mientras que el lado correspondiente al apical contenía solo el medio Opti-MEM.

Posteriormente, se adiciona al lado apical, una solución de ^{55}Fe como parte de un complejo de $^{55}\text{FeCl}_3\text{-NTA}$ (2: 2.2, mol: mol, durante 1 hora a 37°C)(Tapia y col., 1996). Luego el ^{55}Fe asociado a las células y su contenido basolateral fueron cuantificados.

La incorporación de ^{55}Fe a las células y su transporte trans-epitelial, son expresados como pmol de ^{55}Fe por mg de proteína o como porcentaje del control. Cada experimento fue realizado en triplicado.

7.7 Incorporación de hierro radioactivo (^{55}Fe) en duodeno de rata.

Ratas Fisher de 2 meses de edad fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de 30 mg/Kg de ketamina, posteriormente la sección duodenal del intestino fue retirada, lavada con tampón salino fosfato (pH 7) y ligada en sus partes proximal y distal.

El lado luminal del duodeno se llenó con DMEM y se colocó sobre una placa de petri que contenía Medio-Hepc. Se realiza una incubación durante 6 horas a 37°C . Posteriormente, al medio que se encuentra en contacto con el lumen

intestinal se le adiciona ^{55}Fe -NTA 5 μM , continuando la incubación por otras dos horas. La incorporación de ^{55}Fe fue detenida por lavado del lumen intestinal con 2 mL de una alícuota de un tampón salino frío, suplementado con EDTA 1mM. La radioactividad de ^{55}Fe fue determinada en el lado duodenal y en el medio externo.

7.8 Extractos celulares y análisis mediante western blot.

Las células fueron removidas de las placas de cultivo posterior a una incubación de 5 minutos en tampón salino TRIS-EDTA (40 mM Tris, 100 mM NaCl y 1 mM EDTA, pH 7.4). Luego se obtuvieron los extractos celulares tratando las células con tampón de lisis (50 μl por 1×10^6 de células con MOPS 10 mM, pH 7.5, MgCl_2 3 mM, KCl 40 mM, fenil metil sulfonil fluoruro 1mM, leupeptin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aprotinin 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pepstatin A 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, glicerol 5%, ditiotretitol 1 mM y triton X-100, 0.1%).

Las muestras fueron incubadas por 15 minutos en hielo y centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos, los sobrenadantes fueron guardados a -20°C .

La concentración de proteínas fue determinada usando el ensayo de proteínas de ácido bicinchoninico (BCA).

Para la obtención de extractos de duodeno, los segmentos de intestino fueron cortados, la porción luminal extraída y raspada suavemente con un cubre objeto. El tejido colectado fue transferido a tubos ependorf y se realizó la extracción de proteínas.

Para la detección de Hpc los extractos fueron corridos en un gel de poliacrilamida al 16%, Tricina SDS (Schagger y von Jagow, 1987). Seguido a la electroforesis,

las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y bloqueada en leche 5%.

7.9 Inmunocitoquímica

Células caco-2 fueron cultivadas en placas de petri sobre cubre objetos durante 48 horas con Medio-Hepc. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldeido 4% (PFA) por 10 minutos, y permeabilizadas con 0,2% de triton X-100 en tampón salino-fosfato pH 7,4.

Una incubación de 16 horas a 4°C con los anticuerpos contra Hepc, DMT-1, FP o calreticulina (según el experimento), fue seguida de una incubación con Alexa Fluor 488 IgG de conejo, o Alexa Fluor 594 IgG de ratón, por 2 horas a temperatura ambiente.

La inmuno detección fue realizada por microscopía confocal como fue descrito anteriormente (Aguirre y col., 2005).

7.10 Biotinilación

Los ensayos de biotinilación fueron realizados específicamente para FP; con el objetivo de estudiar su localización en células caco-2 y en macrófagos. En este ensayo las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C con 0,5 mg/mL NHS-imino biotin (Pierce, Rockford, IL). Posteriormente, las células fueron lavadas y se prepararon los extractos celulares. Cada extracto celular fue incubado a 4°C por 12 hr con 50% de estreptavidina en perlas de sefarosa. Luego el pellet de estreptavidina-biotina fue disuelto en tampón de carga-SDS, hervido durante 5

minutos y analizado por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 10%. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa para su análisis mediante western blot.

VIII. RESULTADOS

8.1 Producción de hepcidina por células de hepatoma humano HepG2.

Se realizó un ensayo de western blot para Hpc en extractos de células HepG2, transfectadas con el plasmidio pCDNA3-Hpc. En ellos se observó una tinción inmuno reactiva correspondiente a una banda de 10 Kda. Esta banda ha sido descrita previamente en extractos de hígado humano y cerdo, y corresponde al pro-péptido de Hpc (Krause y col., 2000). Como control se cargó un extracto proteico de una línea celular no relacionada, las células de neuroblastoma SH-SY5Y, la cual no presentó tinción.

Como era esperado, la banda de 10 Kda también fue observada en extractos de células HepG2 sin transfectar, aunque con una menor intensidad (Figura 4 A).

Inmunotinción de Hpc en células cultivadas con Fe-NTA 5 μ M, reveló una señal basal, correspondiente a los niveles de producción de Hpc bajo condiciones normales (Fe 5 μ M). La señal se vio aumentada cuando las células fueron tratadas con Fe 40 μ M y al ser transfectadas con el plasmidio pCDNA3-Hpc (Figura 4B).

Estos resultados indican que la estrategia de transfección utilizada dio resultado, con un notorio incremento en la expresión de Hpc. Adicionalmente, mostraron que las células no transfectadas responden a incrementos de Fe, debido a un aumento en la síntesis de Hpc.

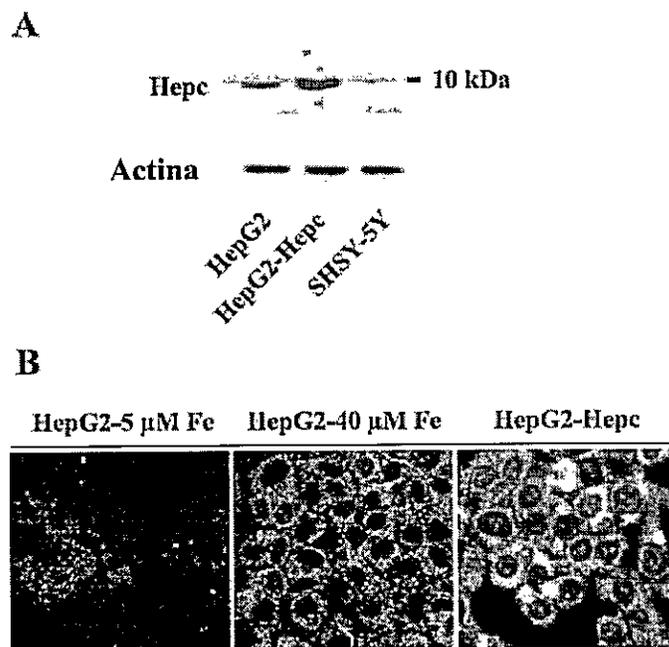


Figura 4. Producción de hepcidina por células HepG2. La expresión de Hepc en células HepG2 fue testada mediante western blot (A) e inmunotinción (B). Panel A: Extractos de células HepG2 transfectadas con el plasmidio pCDNA3-Hepc mostraron una banda de 10 Kda correspondiente al pro-péptido de Hepc, mientras que células HepG2 no transfectadas también muestran la banda, pero con menor intensidad. Como control se analizó la presencia de Hepc en una línea celular no relacionada, células SH-SY5Y, en las que no se observó la banda. Como control fue utilizada actina. (B) Análisis de Inmunofluorescencia de Hepc. Células HepG2 fueron transfectadas con el plasmidio pCDNA3-Hepc. Paralelamente, cultivos de células HepG2 no transfectadas, fueron incubados con 5 o 40 μ M de Fe (HepG2-5 μ M Fe y HepG2-40 μ M Fe). Las células fueron fijadas e immuno-teñidas como fue descrito en métodos. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal Zeiss 510.

8.2 Distribución de hepcidina en células caco-2.

El conocimiento de la localización subcelular de Hepc en las células del epitelio intestinal puede ser de gran importancia para entender su mecanismo de acción. Por este motivo se analizó la distribución sub-celular de Hepc en células caco-2, crecidas bajo tratamiento con Medio-Hepc, usando microscopía confocal (Figura 5). Las secciones confocales fueron tomadas desde la dirección apical hacia la basal (panel A).

La marca para Heps mostró una localización citosólica (panel B). Posteriormente, ensayos de co-inmunofluorescencia, mostraron colocalización entre Heps y calreticulina, marcador de retículo endoplasmático (RE) (Panel C). Similares resultados fueron obtenidos después de 24 y 48 horas de incubación con el Medio-Heps (resultados no mostrados).

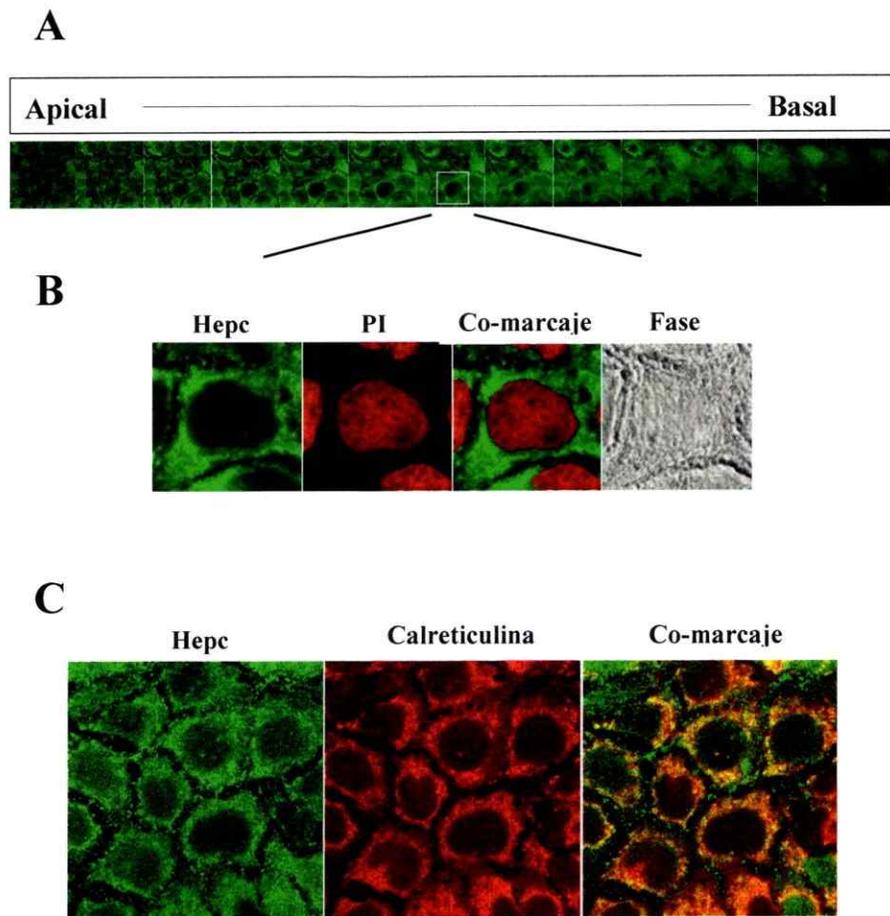


Figura 5. Localización subcelular de hepcidina en células caco-2. Las células caco-2 fueron tratadas durante 24 horas con Medio-Hepc. Posteriormente, las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con el anticuerpo policlonal contra Hepc, seguido por una incubación con Alexa 488-goat IgG contra conejo. En el panel A y B las células fueron comarcadas con Ioduro de Propidio (IP), marcador nuclear. En el panel C, las células fueron co-marcadas con el anticuerpo monoclonal contra calreticulina, y posteriormente, con Alexa Fluor 594 goat-IgG contra ratón. Panel A: Sección confocal de polos apicales y basales de células caco-2 de 1 μ m de diámetro. Panel B: Amplificación de una célula en A, muestra un patrón citoplasmático para la marca de Hepc. PI: Ioduro de propidio, tinción nuclear. Co-marcaje: sobre posición de la marca para Hepc y núcleo. Fase: imagen de contraste de fase. Panel C: colocalización entre Hepc y el marcador de RE calreticulina.

8.3 Hepcidina disminuye la incorporación apical de hierro en células caco-2 y en duodeno de rata.

El incremento de los niveles de Fe en el organismo produce como respuesta un aumento en la síntesis de Hpc en el hígado, lo que a su vez se ve traducido en un aumento de su secreción a la circulación sanguínea (Delaby y col., 2005; Ganz, 2006; Pigeon y col., 2001). De esta forma, Hpc secretada cumple su función, induciendo la degradación de FP en macrófagos (Knutson y col., 2005).

Probamos el efecto de Medio-Hpc en ensayos de transporte de Fe radioactivo, en células caco-2 y duodeno de rata. Las células caco-2 crecen en forma polarizada, lo que, al ser sembradas en insertos bicamerales, permite la determinación del transporte de Fe apical y transepitelial (Alvarez-Hernandez y col., 1991; Tapia y col., 1996).

La incubación de células caco-2 con el medio condicionado rico en Hpc mostró una inhibición tiempo-dependiente de la incorporación apical de Fe (Figura 6^a). La incorporación apical fue inhibida al menos un 50% después de 6 hrs de incubación y un 70% después de 16 hrs. La inhibición obtenida con el medio condicionado fue completamente abolida cuando el medio fue previamente inmuno-depletado de Hpc (Figura 6B). Una inhibición no significativa en la incorporación apical de Fe fue observada cuando las células se incubaron con un medio condicionado derivado de células HepG2, de células HepG2 transfectadas con el plasmidio Hpc o del medio condicionado proveniente de células HepG2 transfectadas con una Hpc inactiva (Figura 6B). El análisis de esta última condición fue necesario

para la diferenciación del efecto entre Hepc y otros compuestos que pueden estar presentes en el medio condicionado que puedan causar el efecto.

El tratamiento con Hepc también disminuyó las cantidades de Fe radioactivo del lado basolateral, pero esta disminución no fue significativa, al ser comparada con el control (Figura 6C).

Adicionalmente, la cantidad de ^{55}Fe transferido al medio basolateral parece reflejar la cantidad de Fe incorporado durante la absorción apical, debido a que cuando el valor es corregido por la incorporación de ^{55}Fe total (^{55}Fe en las células más el Fe presente en el medio basolateral), la inhibición no es aparente (datos no mostrados).

Posteriormente, evaluamos la capacidad de Hepc de modificar la captación de Fe en segmentos de duodeno de rata. De este modo, el lado externo (seroso) fue preincubado con los medios: control, medio condicionado con Hepc o medio inmuno-depletado de Hepc.

El medio condicionado rico en Hepc indujo una baja significativa en la incorporación de ^{55}Fe luminal, comparado con el medio control. Este efecto no fue observado cuando el medio fue previamente inmuno-depletado de Hepc (Figura 6 D). Estos resultados indican que en células intestinales, Hepc inhibe fuertemente la incorporación apical de Fe, pero no afecta su transporte basolateral.

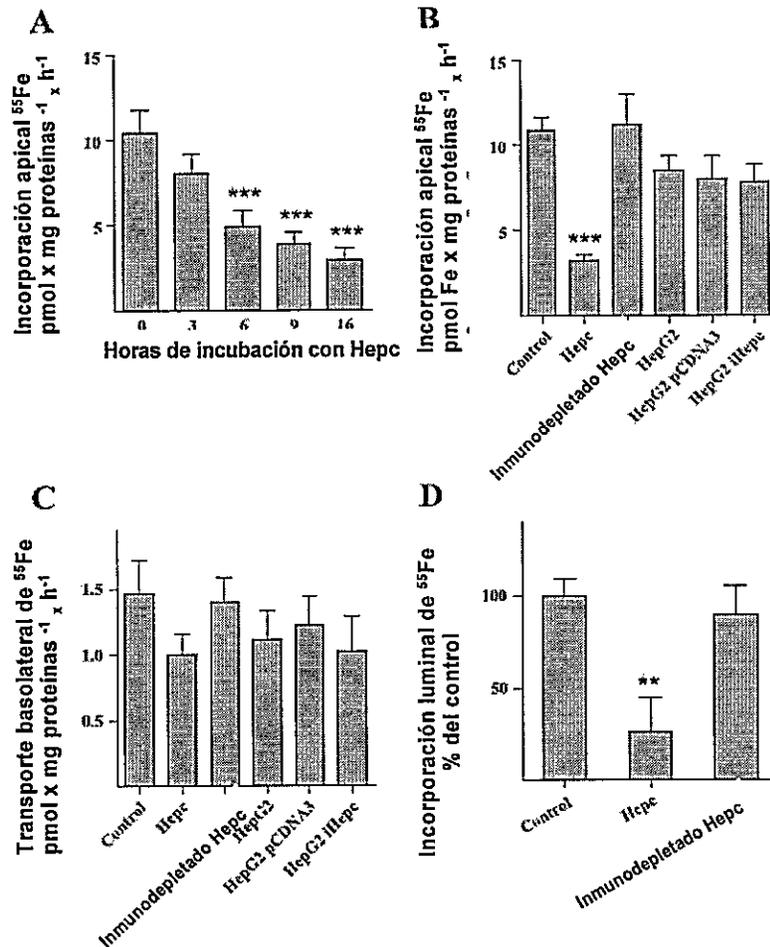


Figura 6. Hecpídina inhibe la incorporación de hierro en células caco-2 y en duodeno de rata. A: Efecto de Hepc sobre la incorporación de ^{55}Fe en células caco-2. Células caco-2 crecidas en insertos bicamerales fueron pre-tratadas por los tiempos indicados, con un medio condicionado rico en Hepc. Posteriormente, se realizó un ensayo de incorporación apical de ^{55}Fe durante 1 hora a 37°C , como fue descrito en Métodos. Los datos corresponden a la media $\text{DS} \pm$ de experimentos realizados en triplicado. B: incorporación de ^{55}Fe por células caco-2. Células caco-2 crecidas en insertos bicamerales fueron tratadas por 16 horas con: el medio de cultivo OptiMEM sin tratamiento (Control), medio de cultivo proveniente desde células HepG2 no transfectadas (HepG2), medio de cultivo de células HepG2 transfectadas con el plasmidio pCDNA3 (HepG2-pCDNA3), medio de cultivo de células HepG2 transfectadas con el plasmidio pCDNA3-Hepc (HepG2-Hepc) o con un medio de cultivo de células HepG2 transfectadas con un plasmidio que codifica para una Hepc inactiva mutante (HepG2-iHepc). Los insertos fueron incubados con ^{55}Fe -NTA $5 \mu\text{M}$ en el lado apical durante 1 hora a 37°C . *** $P < 0,001$, comparado con el medio control. C: Transporte transepitelial de Fe radioactivo en células caco-2. Células caco-2 crecidas en insertos bicamerales fueron tratadas con los medios descritos en B. El contenido de ^{55}Fe en el lado basolateral fue cuantificado. D: Incorporación de Fe radioactivo por intestino duodenal de rata. Segmentos duodenales de

intestino de rata fueron preincubados durante 6 horas a 37°C en placas de Petri que contenían medio de cultivo control, medio condicionado rico en Hepc o medio condicionado depletado de Hepc. Posteriormente, se agregó ⁵⁵Fe-NTA 5 µM en el lumen intestinal y la incubación se continuó por dos horas. La radioactividad del ⁵⁵Fe fue determinada en el tejido duodenal y en el medio. La incorporación de ⁵⁵Fe fue expresada como porcentaje de la incorporación del control. ** P<0,01, versus controles.

8.4 Expresión de la cantidad de proteína y RNA mensajero para DMT-1 y FP.

El RNA mensajero de células caco-2 tratadas por 12 horas con el Medio-Hepc, fue analizado con el fin de determinar los niveles de expresión de DMT-1 y FP, mediante la técnica de RT-PCR semi-cuantitativo (Figura 7A). El RT-PCR para DMT-1 fue realizado para la isoforma DMT-1+IRE, puesto que corresponde a la variante que responde al contenido de Fe celular (Hubert y Hentze, 2002). Una disminución de 50% en la expresión del RNA mensajero para DMT-1, fue observada cuando las células fueron previamente tratadas con el Medio-Hepc, en comparación a las tratadas con un medio control (Figura 7B). En contraste, bajo las mismas condiciones no se encontraron cambios significativos en la expresión del ARN mensajero para FP.

Para determinar si la baja en los niveles de mensajero de DMT-1 se debía a una baja en los niveles de transcripción o a un aumento en la degradación del transcrito, analizamos los niveles de mensajero después de un tratamiento con el inhibidor transcripcional actinomicina D, en ausencia o presencia de Hepc (Figura 7C). No se observaron diferencias en la tasa de degradación entre el control y las células tratadas con Hepc posterior a las 6 horas de incubación.

Estos resultados sugieren que Hepc puede regular la expresión del transportador DMT-1, en un modelo celular de intestino.

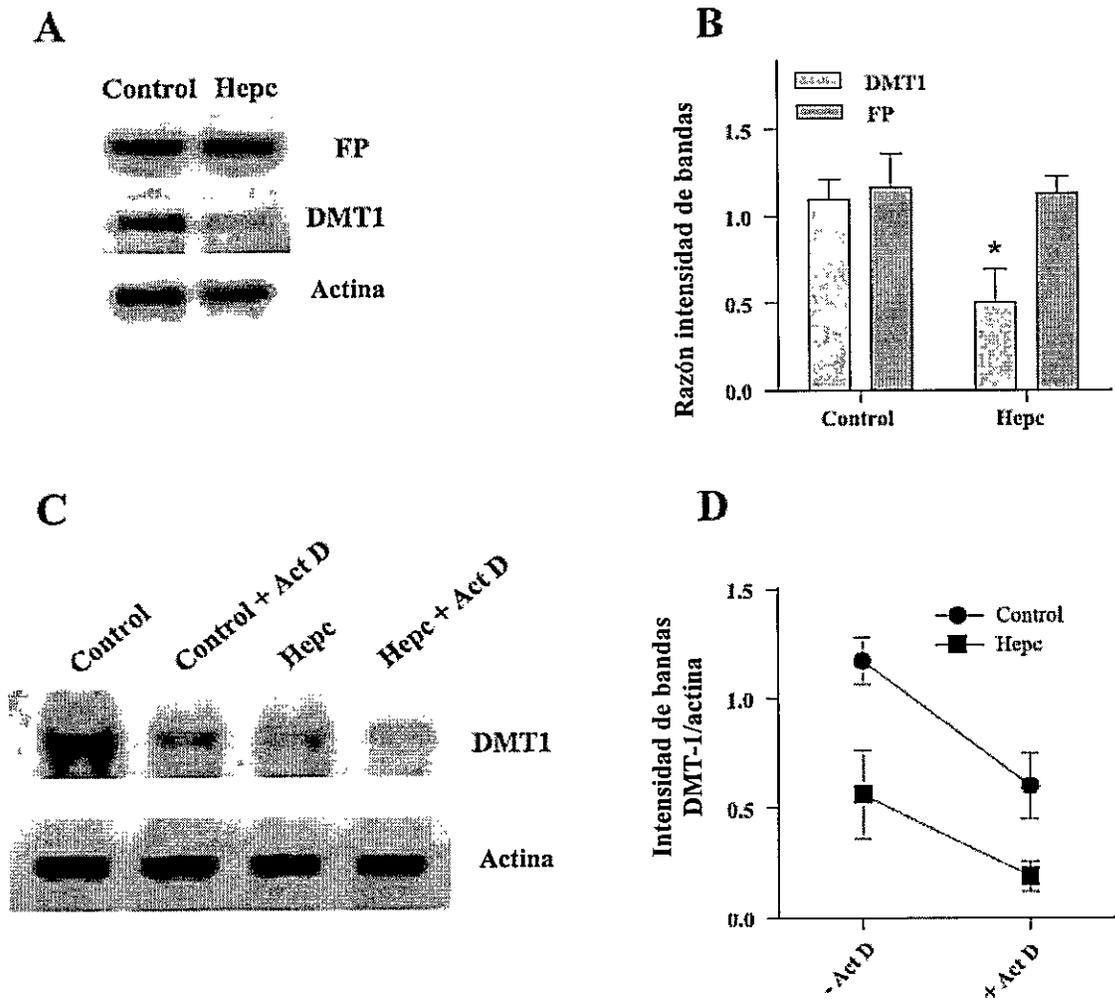


Figura 7. Efecto de Hepcidina sobre los ARN mensajeros de los transportadores DMT-1 y FP en células caco-2. A: células caco-2 fueron incubadas por 12 horas en un medio condicionado rico en Hepe o en un medio control. El ARN total fue extraído y la expresión de DMT-1 y FP determinada por RT-PCR semi-cuantitativo. La expresión del ARN mensajero de actina fue utilizada como control de carga. B: la intensidad de las bandas en A fue cuantificada por densitometría y normalizada por la expresión del mensajero de actina. C: Las células se incubaron por 6 horas en presencia o ausencia de 5 μ g/mL del inhibidor transcripcional actinomicina D. El ARNA total fue extraído, y la expresión de DMT-1 fue determinada por RT-PCR semi-cuantitativo. D: Las bandas correspondientes en C fueron cuantificadas por densitometría y normalizadas por el control de carga correspondiente al valor del mensajero de actina. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes \pm SD.

8.5 Hecidina inhibe la expresión de DMT-1, pero no de FP en células caco-2 y en duodeno de rata.

Para investigar si los cambios en el RNA mensajero de DMT-1 y FP eran traducidos en cambios en sus niveles de proteína, se analizaron mediante western blot sus niveles de expresión en células caco-2 y en duodeno de rata (Figura 8).

Los resultados indicaron que la banda para DMT-1 decrece significativamente tanto en células caco-2 como en secciones duodenales, tratadas con el medio condicionado rico en Hecp. No se observaron cambios en la expresión de FP. Los patrones de expresión para estas proteínas son consistentes con los experimentos de incorporación de ^{55}Fe y RT-PCR, anteriormente reportados.

Estos resultados sugieren fuertemente que Hecp regula negativamente la expresión del transportador DMT-1.

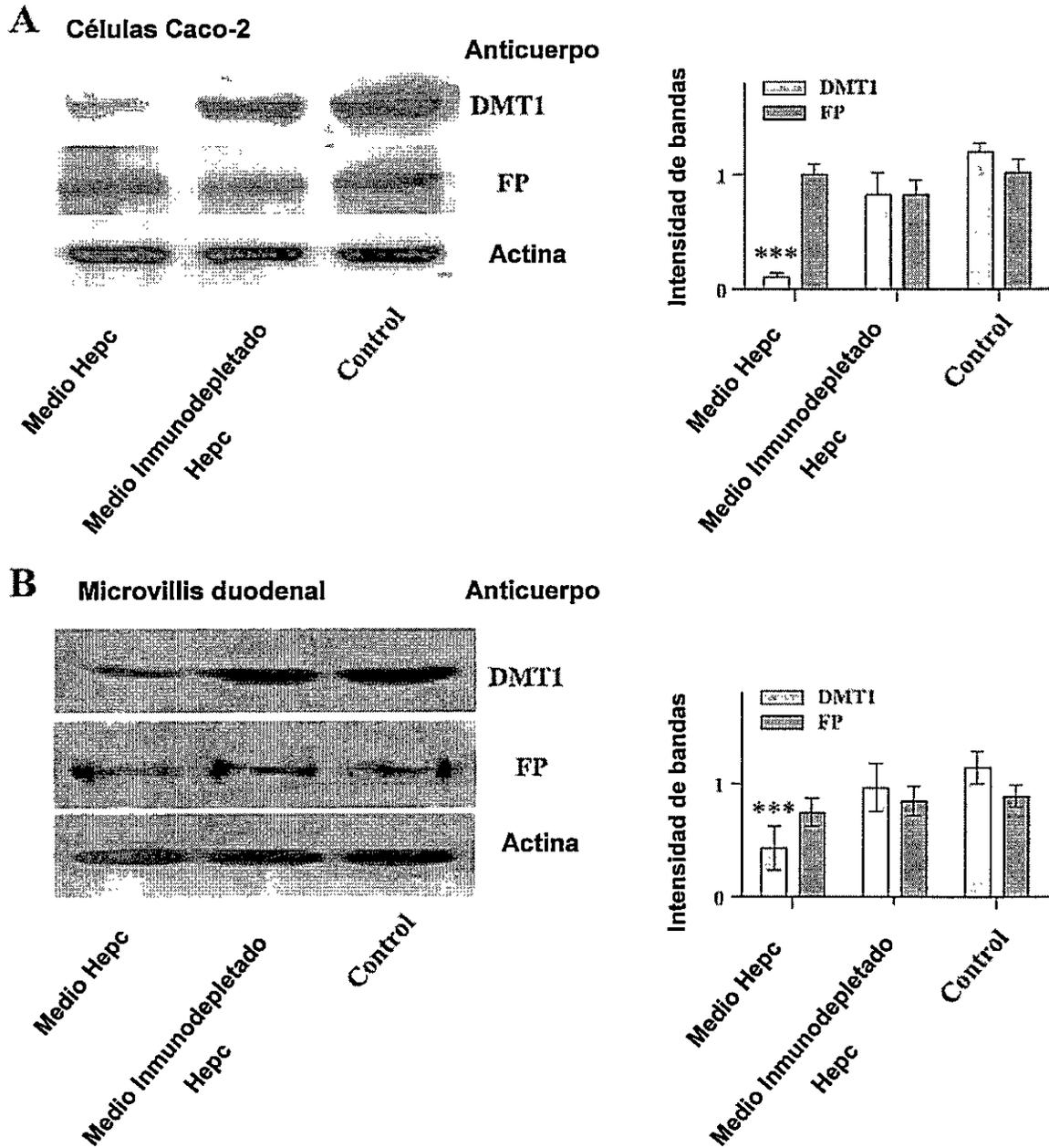


Figura 8. Hecpídina inhibe la expresión de DMT-1, pero no de FP en células caco-2 y en duodeno de rata. A: Análisis de western blot para DMT-1 y FP de células caco-2 tratadas durante 8 horas con el medio condicionado rico en Hecp (Hecp-medio), Medio condicionado depletado de Hecp o Medio OptiMEM sin tratamiento (Control). La determinación de FP fue realizada en las membranas previamente utilizadas para la detección de DMT-1. Actina fue utilizada como control de carga. B: western blot para DMT-1 y FP de duodeno de rata. Segmentos duodenales fueron tratados durante 6 horas con el medio condicionado rico en Hecp, con el medio condicionado inmuno-depletado o con medio OptiMEM sin tratamiento (Control). Todos los experimentos fueron normalizados por actina.

8.6 Análisis de inmunofluorescencia de DMT-1 y FP.

La inmunotinción de DMT-1 y FP en células caco-2 tratadas con el Medio-Hepc, mostró una marcada disminución en la tinción de DMT-1, sin cambios aparentes en la tinción para FP. Esta tinción de patrones observada concuerda con los resultados de western blot y RT-PCR realizados (descritos anteriormente) y sugieren fuertemente que existe un efecto principal de Hepc en la disminución de la expresión de DMT-1.

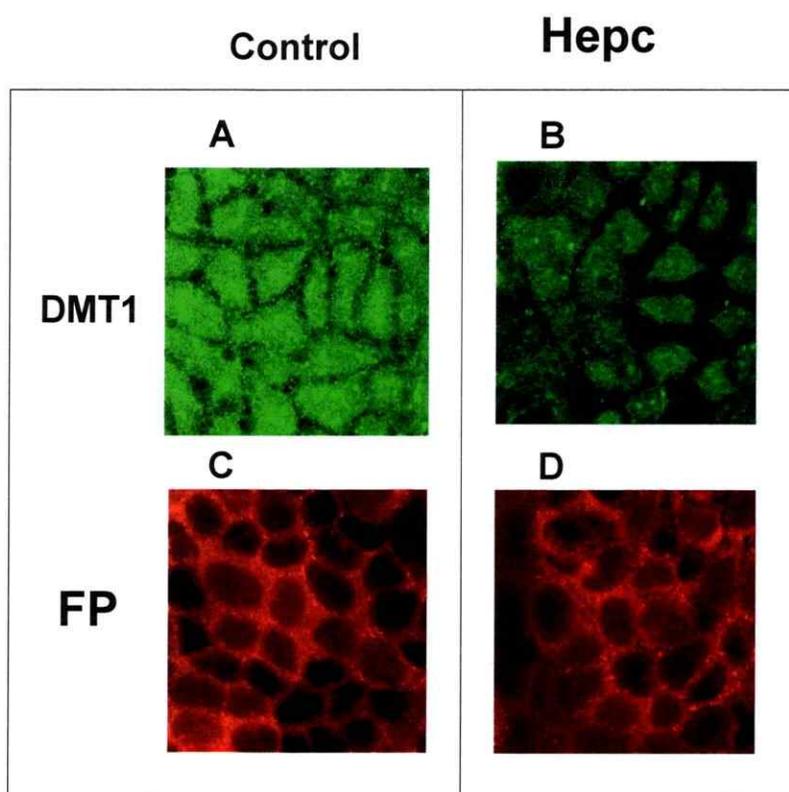


Figura 9. Análisis de inmunofluorescencia de DMT-1 y FP en células caco-2. Células caco-2 fueron tratadas durante 48 horas con el Medio-Hepc y con medio control. Posteriormente las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con el anticuerpo contra DMT-1, o el anticuerpo policlonal contra FP, según sea el caso. Una disminución en la marca para DMT-1 fue aparente en las células tratadas con el Medio-Hepc. (Panel B), cuando comparamos esto con el medio control (Panel A), mientras que no se observan cambios aparentes en la marca correspondiente a FP en ninguno de los dos casos (Panel C y D).

8.7 Efecto de hepcidina sobre la distribución de FP en la membrana de células caco-2 y macrófagos J774.

Para determinar si la inhibición de la incorporación apical de Fe mediada por Hpc es un efecto primario o secundario a la degradación de FP, se investigó la distribución de FP en la membrana plasmática de células caco-2, expuestas a Hpc. Como control, en este experimento fue utilizada la línea celular de macrófago J774, en la cual se ha reportado que Hpc induce una disminución de FP (Laftah y col., 2004; Yamaji y col., 2004). Las células fueron expuestas a Hpc durante cortos periodos de tiempo, posterior a los cuales se analizó la expresión de FP. En la línea J774 se observó que el tratamiento con Hpc disminuía el contenido de proteína total y de membrana de FP.

La cinética de la localización de FP total y de membrana fue diferente. El contenido de FP total disminuyó después de 1 hora de tratamiento con Hpc, pero aumentó a niveles normales a las 3 horas.

Investigaciones anteriores han reportado fluctuaciones en la expresión de FP frente a Hpc en intestino de rata (Knutson y col., 2005). Los cambios en los niveles de FP de membrana fueron menor (Figura 10 C), disminuyendo después de dos horas de tratamiento con Hpc, y manteniéndose bajos hasta las cuatro horas (Figura 10 B). Estos resultados corroboran datos anteriores sobre el efecto de Hpc en las células J774 (Knutson y col., 2003).

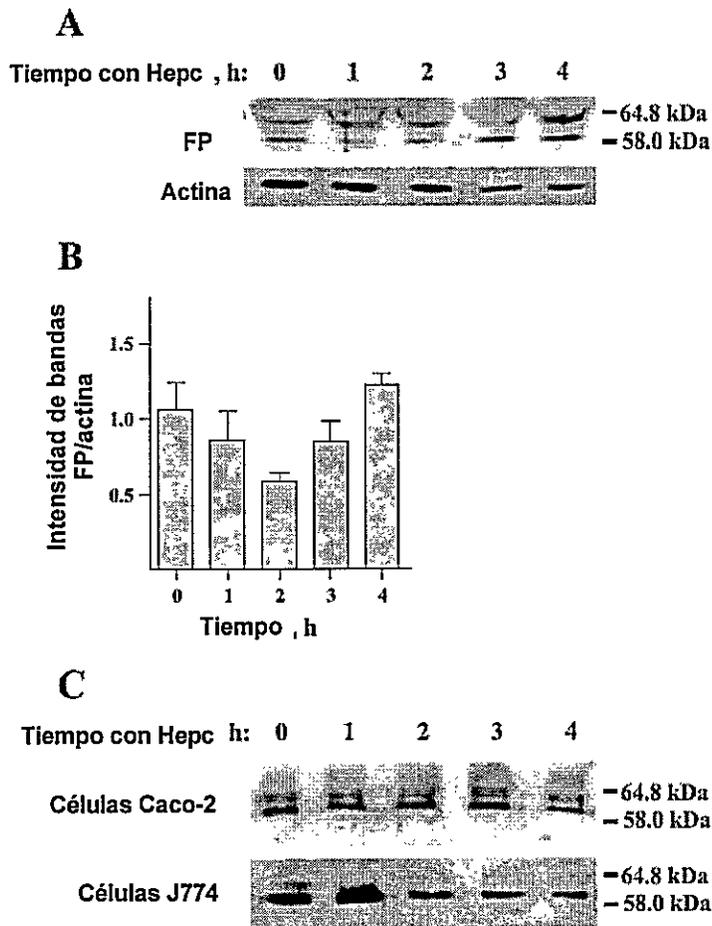


Figura 10. Efecto de Hepsidina sobre los niveles de FP en células caco-2 y J774. A: Contenido total de FP en células J774. En extractos de células J774 incubadas con Medio-Hepc, durante los tiempos indicados, se analizó la expresión de FP mediante western blot. Dos bandas inmuno reactivas de 64,8 y 58 KDa fueron detectadas. Ambas bandas son específicas puesto que ellas no se observan, cuando el anticuerpo es preincubado con el péptido correspondiente a FP (datos no mostrados). Como control de carga se utilizó Actina. Los datos representan la media \pm DS de tres experimentos independientes. C: biotilación e inmuno detección de FP en membrana. Células caco-2 fueron incubadas en su lado basolateral, con Medio-Hepc durante los tiempos indicados. Posteriormente, las células fueron llevadas a 4°C, y biotiladas por el medio basolateral. Las bandas representan a FP presente en la membrana basolateral. Como control, el experimento fue repetido en las células J774, donde existen reportes que Hepc sí presenta un efecto sobre la expresión de FP.

IX. DISCUSIÓN

El importante papel de Hcp en la absorción intestinal de Fe fue descrito en estudios realizados en ratones knockout para el factor de transcripción USF2, los cuales mostraban una pérdida en la expresión de Hcp y posterior sobre carga de Fe en diferentes tejidos (Nicolas y col., 2001).

Trabajos posteriores mostraron que Hcp induce la endocitosis y degradación de FP (Delaby y col., 2005; Knutson y col., 2005; Knutson y col., 2003; Nemeth y col., 2004) Esto en células no intestinales (HEK-293, HeLa y macrófagos), comportamiento que fue subsecuentemente extrapolado para sugerir que Hcp regularía la absorción intestinal de Fe mediante la internalización y degradación de FP (Frazer y Anderson, 2005; Ganz, 2006). Por el contrario, otras investigaciones habían demostrado que Hcp reducía la absorción de Fe en ratones y células intestinales caco-2 (Laftah y col., 2004; Yamaji y col., 2004). Sin embargo, en ambos casos trabajos las concentraciones usadas para Hcp sintética fueron entre 10 y 1000 ordenes de magnitud mayores a los reportados en el suero y orina (Aumelas y col., 1996; Krause y col., 2000), generando esto una duda sobre la extrapolación de los datos obtenidos al sistema *in vivo*.

Es por esto que el mecanismo por el cual Hcp regula la absorción de Fe intestinal estaba aún pobremente definido.

Usando células caco-2 y duodeno de rata como modelos del epitelio absortivo, en esta tesis se estudió el papel de Hcp en la regulación de la absorción intestinal de Fe.

Por medio de transfección, se sobre expresó Hepc obteniéndose un medio condicionado rico en Hepc.

Se determinó que Hepc disminuye tanto la incorporación apical de Fe como los niveles del RNA mensajero y proteína del transportador apical, DMT-1, sin afectar la expresión del transportador de salida FP.

Estos resultados nos permiten concluir que la disminución en la incorporación apical de Fe se debe al efecto de Hepc sobre la transcripción génica de DMT-1, y no se debe a un aumento en la degradación de FP.

Este resultado está de acuerdo con un reporte en el cual se muestra que una baja en la expresión de Hepc en ratas, se correlaciona con un incremento en la expresión duodenal de DMT-1, en etapas de deficiencia de Fe y preñez (Millard y col., 2004). Los mismos autores reportan que no se observan cambios en el mensajero de FP, reportando un leve aumento en los niveles de la proteína para FP, bajo condiciones de deficiencia de Fe.

Similarmente, se ha reportado una baja en los niveles de Hepc y un incremento duodenal de DMT-1 y FP, en ratones tratados con 10-20% de etanol durante 7 días (Harrison-Findik y col., 2006). La respuesta de DMT-1 fue abolida mediante el uso de antioxidantes o inyecciones del péptido de Hepc sintética, indicando que Hepc media una respuesta transcripcional, que resulta en una disminución de la expresión duodenal de DMT-1. Los detalles involucrados en esta vía de regulación negativa, requieren estudios futuros.

La baja de expresión de DMT-1 en respuesta a Hepc reportada en este trabajo, más las publicaciones previas en las células J774 y HEK-293, son consistentes con un mecanismo en el cual Hepc disminuye los niveles de Fe circulante (i)

mediante la inhibición del transportador DMT-1 en el intestino y (ii) por inhibición de la salida de Fe desde los macrófagos ejerciendo de esta manera un mecanismo tejido específico.

El posterior análisis de factores que respondan a la acción de Hpc podrán determinar más específicamente las vías de regulación del Fe en nuestro organismo.

X CONCLUSIONES

1. Se clonó Hepc en el plasmidio pCDNA3 y se obtuvo un medio condicionado rico en Hepc.
2. Se determinó que las células caco-2 incorporan Hepc y que ésta presenta una distribución citoplasmática.
3. Mediante radioactividad se determinó que Hepc producía una disminución apical en la incorporación de Fe en células caco-2 y en duodeno de rata.
4. Hepc disminuye significativamente los niveles de ARN mensajero y proteína del transportador apical de Fe DMT-1, en células caco-2 y en duodeno de rata.
5. Hepc no tiene ningún efecto sobre los niveles de ARN mensajero y proteína del transportador basolateral de Fe en células caco-2 y en duodeno de rata.
6. En la línea celular de macrófagos Hepc no produce efectos sobre el transportador DMT-1, pero sí afecta al transportador FP disminuyendo su expresión

XI. REFERENCIAS

- Aguirre, P., Mena, N., Tapia, V., Arredondo, M., and Nunez, M.T. (2005). Iron homeostasis in neuronal cells: a role for IREG1. *BMC Neurosci* 6, 3.
- Aisen, P., Enns, C., and Wessling-Resnick, M. (2001). Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 940-959.
- Alvarez-Hernandez, X., Nichols, G.M., and Glass, J. (1991). Caco-2 cell line: a system for studying intestinal iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochim Biophys Acta* 1070, 205-208.
- Andrews, N.C., and Levy, J.E. (1998). Iron is hot: an update on the pathophysiology of hemochromatosis. *Blood* 92, 1845-1851.
- Arredondo, M., Munoz, P., Mura, C.V., and Nunez, M.T. (2001). HFE inhibits apical iron uptake by intestinal epithelial (Caco-2) cells. *FASEB J* 15, 1276-1278.
- Aumelas, A., Mangoni, M., Roumestand, C., Chiche, L., Despaux, E., Grassy, G., Calas, B., and Chavanieu, A. (1996). Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur J Biochem* 237, 575-583.
- Beinert, H., and Kiley, P.J. (1999). Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Curr Opin Chem Biol* 3, 152-157.
- Canonne-Hergaux, F., Gruenheid, S., Ponka, P., and Gros, P. (1999). Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* 93, 4406-4417.
- Davies, P.S., and Enns, C.A. (2004). Expression of the hereditary hemochromatosis protein HFE increases ferritin levels by inhibiting iron export in HT29 cells. *J Biol Chem* 279, 25085-25092.
- Delaby, C., Pilard, N., Goncalves, A.S., Beaumont, C., and Canonne-Hergaux, F. (2005). Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood* 106, 3979-3984.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C., and Comella, J.X. (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* 75, 991-1003.
- Frazer, D.M., and Anderson, G.J. (2005). Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G631-635.
- Ganz, T. (2006). Hepcidin--a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism. *Curr Top Microbiol Immunol* 306, 183-198.
- Garcia, M.N., Flowers, C., and Cook, J.D. (1996). The Caco-2 cell culture system can be used as a model to study food iron availability. *J Nutr* 126, 251-258.
- 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. *Nature* 388, 482-488.
- Harrison-Findik, D.D., Schafer, D., Klein, E., Timchenko, N.A., Kulaksiz, H., Clemens, D., Fein, E., Andriopoulos, B., Pantopoulos, K., and Gollan, J. (2006). Alcohol metabolism-

mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem* 281, 22974-22982.

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

Hubert, N., and Hentze, M.W. (2002). Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12345-12350.

Knutson, M.D., Oukka, M., Koss, L.M., Aydemir, F., and Wessling-Resnick, M. (2005). Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1324-1328.

Knutson, M.D., Vafa, M.R., Haile, D.J., and Wessling-Resnick, M. (2003). Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FP1) expression in J774 macrophages. *Blood* 102, 4191-4197.

Krause, A., Neitz, S., Magert, H.J., Schulz, A., Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P., and Adermann, K. (2000). LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 480, 147-150.

Kulaksiz, H., Gehrke, S.G., Janetzko, A., Rost, D., Bruckner, T., Kallinowski, B., and Stremmel, W. (2004). Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut* 53, 735-743.

Laftah, A.H., Ramesh, B., Simpson, R.J., Solanky, N., Bahram, S., Schumann, K., Debnam, E.S., and Srail, S.K. (2004). Effect of hepcidin on intestinal iron absorption in mice. *Blood* 103, 3940-3944.

Millard, K.N., Frazer, D.M., Wilkins, S.J., and Anderson, G.J. (2004). Changes in the expression of intestinal iron transport and hepatic regulatory molecules explain the enhanced iron absorption associated with pregnancy in the rat. *Gut* 53, 655-660.

Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., and Kaplan, J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306, 2090-2093.

Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., and Vaulont, S. (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8780-8785.

Nunez-Millacura, C., Tapia, V., Munoz, P., Maccioni, R.B., and Nunez, M.T. (2002). An oxidative stress-mediated positive-feedback iron uptake loop in neuronal cells. *J Neurochem* 82, 240-248.

Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., and Ganz, T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276, 7806-7810.

Peterson, M.D., Bement, W.M., and Mooseker, M.S. (1993). An in vitro model for the analysis of intestinal brush border assembly. II. Changes in expression and localization of brush border proteins during cell contact-induced brush border assembly in Caco-2BBE cells. *J Cell Sci* 105 (Pt 2), 461-472.

Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., and Loreal, O. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276, 7811-7819.

- Roy, C.N., Penny, D.M., Feder, J.N., and Enns, C.A. (1999). The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *J Biol Chem* 274, 9022-9028.
- Ryter, S.W., and Tyrrell, R.M. (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28, 289-309.
- Schagger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Snyderman, R., Pike, M.C., Fischer, D.G., and Koren, H.S. (1977). Biologic and biochemical activities of continuous macrophage cell lines P388D1 and J774.1. *J Immunol* 119, 2060-2066.
- Sofic, E., Riederer, P., Heinsen, H., Beckmann, H., Reynolds, G.P., Hebenstreit, G., and Youdim, M.B. (1988). Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm* 74, 199-205.
- Takami, T., and Sakaida, I. (2011). Iron regulation by hepatocytes and free radicals. *J Clin Biochem Nutr* 48, 103-106.
- Tapia, V., Arredondo, M., and Nunez, M.T. (1996). Regulation of Fe absorption by cultured intestinal epithelia (Caco-2) cell monolayers with varied Fe status. *Am J Physiol* 271, G443-447.
- Wang, J., and Pantopoulos, K. (2011). Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* 434, 365-381.
- Yamaji, S., Sharp, P., Ramesh, B., and Srail, S.K. (2004). Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin. *Blood* 104, 2178-2180.
- Yeh, K.Y., Yeh, M., and Glass, J. (2004). Hepcidin regulation of ferroportin 1 expression in the liver and intestine of the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, G385-394.