

UCH-FC
Biotecnología
L 433
C. 1



Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

**EFFECTO DEL HIERRO HEMÍNICO EN LA EXPRESIÓN DE LOS
GENES INVOLUCRADOS EN LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE
HEM EN CÉLULAS CACO-2.**

Seminario de Título

Entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



Por

Solange M. Le Blanc Soto

Septiembre, 2007

Santiago - Chile

Director de Seminario de Título: Dr. Miguel Arredondo Olguín



“EFECTO DE HIERRO HEMINICO EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE HEM EN CELULAS CACO-2”

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

SOLANGE MARIE LE BLANC SOTO

Dr. Miguel Arredondo Olguín
Director Seminario de Título



Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Marco Tulio Nuñez González
Presidente Comisión

Dr. Christian González- Billault
Corrector



Santiago de Chile, agosto de 2007

A Percy, por hacer posible todo esto.

A Pablo.

A Benjamín.





Todo comenzó un 22 de diciembre de 1982 en Santiago. Hija de Eliana y Hugo, viví mis primeros años en la capital para luego partir a Arica, donde se integró a nuestra familia mi hermana Nicole.

Mis primeros años de estudio comenzaron en la Escuela D-4 siguiendo en el Colegio Integrado Edo. Frei Montalva. Fue aquí donde conocí algunas de las personas más importantes de mi vida, como grandes amigos y profesores, con los cuales reí, lloré y viví momentos inolvidables. Personas que siempre me apoyaron, como cuando partí por intercambio a Alemania y hubo momentos realmente difíciles.

Desde que tengo recuerdo me apasiona la ciencia, fue por eso que decidí estudiar esta carrera. El año 2001 comencé mi aventura en la Universidad, donde nuevamente encontré maravillosas personas con quienes compartir el camino. Encontré también una segunda familia a la cual le agradezco desde lo más profundo de mi corazón todo lo que han hecho por mí.

Sólo espero que este nuevo camino que comienza hoy sea tan hermoso como los que ya he recorrido, que aquellos que me han acompañado lo sigan haciendo y que se integren nuevos compañeros tan maravillosos como los que tengo hasta ahora.

“La ciencia de vivir es el arte de amar”

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres Eliana y Hugo, por todo su amor, por haber confiado siempre en mí y por haber guiado mis primeros pasos.

A mi hermana Nicole, por su amor, apoyo y amistad.

A Cinthia Silva y toda su familia, por la amistad y el gran apoyo que me han entregado en todos estos años y por hacerme sentir parte de su familia.

A los grandes amigos que conocí en mis años de colegio, Kotte, Coka, Yaya, Epi, Pape, Carolina, con los que compartí experiencias inolvidables.

A mis profesores queridos, Silvia Pastén, Guillermo Manríquez, Edith Garrido y Pablo Vilberos, por haber creído siempre en mí.

A mis amigos de la U, Cata, Rodrigo, Mauro, Ricardo, y especialmente a Lore por hacer de estos años de estudio y sacrificio los mejores de la vida, y por supuesto por esas largas e interminables noches de estudio que finalmente valieron la pena.

A todas las personas del Laboratorio de Micronutrientes del INTA, Angélica, Paula, Carola, Sebastián, Denni, Coté y Marcela, por hacer de todos mis días de trabajo algo tan agradable.

A Miguel Arredondo, por permitirme realizar mi tesis en su laboratorio, por su guía, apoyo, confianza y gran paciencia.

Hay mucha gente a quien agradecer en mi vida, cada uno sabe quien es y enumerarlos a todos sería muy difícil ya que lo más seguro es que falten muchos a los que quiero y admiro...por eso, envío mi cariño a todos y espero que sepan cuanto los quiero.



ÍNDICE DE CONTENIDOS



1. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis de Trabajo	12
Objetivo General	12
Objetivos Específicos	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1 Materiales	14
2.2.1 Reactivos	14
2.2.2 Equipos	15
2.1.3 Materiales de cultivo	15
2.1.4 Material Biológico	16
2.2 Métodos	17
2.2.1 Cultivo celular	17
2.2.2 Digestión de hemoglobina	17
2.2.3 Obtención de células Caco-2 sometidas a distintos estímulos con Fe hemínico y no hemínico	17
2.2.4 Extracción de RNA de células Caco-2	18
2.2.5 Síntesis de cDNA a partir de RNA	18
2.2.6 PCR semi-cuantitativo para <i>ho-1</i>	19
2.2.7 PCR semi-cuantitativo para <i>hcp1</i>	19
2.2.8 PCR semi-cuantitativo para <i>flvcr</i>	20
2.2.9 Análisis de los productos de RT-PCR	20
2.2.10 Extractos celulares y determinación del contenido de Fe interno	20
2.2.11 Medición de la actividad de Hem oxigenasa	21
2.2.12 Análisis estadístico	21

3. RESULTADOS	22
3.1 Análisis de la expresión de <i>hcp1</i> , <i>flvcr</i> y <i>ho-1</i> en respuesta a un estímulo de Fe hemínico agudo	22
3.2 Análisis de la expresión de <i>hcp1</i> , <i>flvcr</i> y <i>ho-1</i> en respuesta a un estímulo de Fe hemínico crónico	25
3.3 Análisis de la expresión de <i>hcp1</i> , <i>flvcr</i> y <i>ho-1</i> en respuesta al tiempo de un estímulo de Fe hemínico	27
3.4 Análisis de la expresión de <i>hcp1</i> , <i>flvcr</i> y <i>ho-1</i> en respuesta a un estímulo de Fe no-hemínico	30
4. DISCUSIÓN	32
4.1 Contenido intracelular de Fe en células Caco-2 expuestas a hem	34
4.2 Expresión de <i>hcp1</i> , <i>flvcr</i> y <i>ho-1</i> en respuesta a la concentración de Fe hemínico	34
4.3 Expresión de <i>hcp1</i> , <i>flvcr</i> y <i>ho-1</i> en respuesta al tiempo de estímulo con Fe hemínico	37
5. CONCLUSIONES	39
6. BIBLIOGRAFIA	40



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructuras de las moléculas de hem y hemina	6
Figura 2	Degradación enzimática del hem	9
Figura 3	Regulación de la expresión de <i>ho-1</i>	11
Figura 4	Contenido de Fe interno en células Caco-2 tratadas por 24 horas con concentraciones crecientes de hem	23
Figura 5	Expresión relativa de <i>ho-1</i> y actividad enzimática en células Caco-2 sometidas a distintas concentraciones de hem por 24 hrs.	24
Figura 6	Respuesta de <i>hcp1</i> y <i>flvcr</i> a distintas concentraciones de hem	25
Figura 7	Contenido de Fe interno y expresión de <i>ho-1</i> , <i>hcp1</i> y <i>flvcr</i> en células Caco-2 incubadas por 5 días con hem	27
Figura 8	Niveles de Fe intracelular en células Caco-2 tratadas por diferentes tiempos con 20 μ M hem	28
Figura 9	Relación entre la expresión de <i>ho-1</i> y la actividad HO según el tiempo de exposición a hem	29
Figura 10	Análisis de la expresión de <i>ho-1</i> y <i>flvcr</i> frente al tiempo de estímulo con hem	30
Figura 11	Efecto del Fe no-hem en la expresión de <i>ho-1</i> , <i>hcp1</i> y <i>flvcr</i> en células Caco-2	31
Figura 12	Modelo propuesto para la absorción intestinal de hem	33
Figura 13	Modelo de regulación de la absorción de hem	38



ABREVIATURAS

BSA	: Albúmina sérica de bovino
BVR	: Biliverdina Reductasa
cDNA	: Ácido desoxirribonucleico complementario
CP	: Motivo cisteína-prolina
cRNA	: Ácido ribonucleico complementario
DCT1	: Transportador de cationes divalentes 1
DcytB	: Citocromo duodenal B
DEPC	: Dietilpirocarbonato
DMT1	: Transportador de metales divalentes 1
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
dNTP	: Desoxirribonucleótido trifosfato
ϵ	: Coeficiente de absorción molar
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
Fe	: Hierro
FePP	: Protoporfirina férrica
FLVCR	: Receptor del virus de leucemia felino, subgrupo C
HCP1	: Proteína transportadora de hem 1
HH	: Hemocromatosis hereditaria
HO	: Hem oxigenasa
IRE	: Elemento que responde a hierro
IREG1	: Proteína regulada por hierro 1
IRP	: Proteína reguladora de hierro
kDa	: kiloDalton

MARE	: Elementos de reconocimiento de Maf
MFS	: Superfamilia facilitadora principal
mRNA	: Ácido ribonucleico mensajero
MTP	: Proteína transportadora de metales
NADPH	: Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
Nramp2	: Proteína de macrófago asociada a resistencia natural 2
Nrf2	: Factor relacionado a NF-E2 2
NTA	: Nitriloacetato
ON	: Over night
pb	: pares de bases
PBS	: Tampón fosfato salino
PMSF	: Fenilmetilsulfonil fluoruro
RNA	: Ácido ribonucleico
rpm	: Revoluciones por minuto
RTf	: Receptor de transferrina
RTf-Tf	: Complejo receptor de transferrina-transferrina
RT-PCR	: Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa
TAE	: Tris-acetato-EDTA
Tf	: Transferrina
UA	: Unidades arbitrarias

RESUMEN

El hierro (Fe) es un elemento traza esencial para la gran mayoría de los organismos debido a que participa en múltiples procesos metabólicos. Su absorción a partir de la dieta es llevada a cabo principalmente por las células absortivas del duodeno, las cuales pueden captarlo como Fe hemínico o Fe inorgánico a través de vías diferentes, las cuales deben presentar una eficiente regulación que permita mantener la homeostasis de Fe corporal.

La absorción de Fe inorgánico ha sido mucha más estudiada que la de Fe hemínico, a pesar de que este último es la fuente con mayor biodisponibilidad. El Fe(II) ingresa a la célula a través del transportador DMT1, presente en la membrana apical de los enterocitos duodenales y puede ser almacenado en la proteína Ferritina o ser transportado hacia la circulación por IREG1, localizado en la membrana basolateral.

Hasta hace poco tiempo, el mecanismo por el cual el Fe hemínico es captado los enterocitos duodenales no había podido ser revelado. Recientemente se han evidenciado dos importantes hallazgos en materia de absorción de Fe hemínico: la caracterización molecular de un transportador intestinal de hem denominado HCP1 y la de un exportador de hem en células eritroides, FLVCR, posiblemente implicado también en la absorción del hem desde la dieta dado que se expresa en altos niveles en la línea celular derivada de epitelio intestinal, Caco-2.

En base a la hipótesis de que ambas proteínas participan activamente en la captación y transporte de hem desde el lumen intestino hacia la circulación, y que este proceso debe ser regulado, nos propusimos investigar el efecto del hem en la expresión de *hcp1* y *flvcr* en células Caco-2.

Además, estudiamos la expresión de *ho-1*, (hem oxigenasa), enzima involucrada en la degradación del hem, la cual es inducida en respuesta a hem.

Los resultados obtenidos indican que *flvcr*, al igual que *ho-1*, sufre una inducción en su expresión dependiente tanto de la concentración de hem como del tiempo de exposición al estímulo, mientras que la expresión de *hcp1* no se ve afectada significativamente. Esto sugiere que existiría otro tipo de regulación para *hcp1*, posiblemente a nivel post-traducciona.

Si bien no está totalmente aceptado que la molécula de hem pueda atravesar la célula intestinal de forma intacta y ser translocada a través de la membrana basolateral, el aumento en los niveles de mRNA en presencia de Fe hemínico da cuenta de una regulación mediada por hem, indicativa de una participación activa en el proceso de absorción.

ABSTRACT

Iron (Fe) is an essential metal for most of the organisms, since it participates in multiple metabolic processes. The absorption of dietary Fe is carried out by the mature enterocytes in the duodenum, and it can be absorbed as heme Fe or inorganic Fe, through different and highly regulated pathways, that allows maintains iron homeostasis.

Inorganic Fe absorption has been extensively studied in relation to heme Fe, despite that heme Fe has higher bioavailability than inorganic Fe. Fe(II) uptake occurs through the DMT1 transporter, present in the apical membrane of duodenal enterocytes and can be incorporated into Ferritin –an iron storage protein- or transported to circulation by IREG1, a basolateral Fe exporter.

Recently, two proteins involved in the absorption of heme have been identified: an intestinal heme transporter, named HCP1; and the heme exporter FLVCR. Both, HCP1 and FLVCR exhibit high expression levels in Caco-2 cells, an established model of intestinal epithelial cells.

With the hypothesis that HCP1 and FLVCR play an active role in hem uptake and hem transport from intestinal lumen into the circulation respectively, and that hem absorption must be a regulated process, we investigated the effect of hem in *hcp1* and *flvcr* expression in Caco-2 cells.

We also had studied the expression of *ho-1*, (heme oxygenase), enzyme involved in the intracellular hem degradation, witch it is induced by hem.

Our results indicate that hem induce *flvcr* and *ho-1* in a time- and concentration-dependent manner, while *hcp1* is not significantly induced by hem. These results

suggest that hem uptake by HCP1 might be regulated at a different level, probably post-translational.

At the moment, it is not totally accepted that intact heme molecules can transit the intestinal cells and be translocated through basolateral membrane. The increase in FLVCR mRNA levels in the presence of heme Fe suggests a heme-mediated regulation, participating actively in the absorption process.

1. INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es un metal esencial para la gran mayoría de los organismos debido a que juega un rol crítico en múltiples procesos metabólicos (Huggenvik y cols., 1989). La importancia biológica del Fe es atribuida a sus propiedades químicas de elemento de transición. A pH fisiológico, el estado redox del Fe puede variar rápidamente entre Fe(II) y Fe(III), debido a su capacidad de aceptar y donar electrones, lo cual lo convierte en un elemento muy útil en el centro catalítico de reacciones bioquímicas fundamentales. El Fe presente en el grupo funcional hem, en núcleos hierro-azufre o el asociado directamente con proteínas participa en el transporte de oxígeno, el transporte de electrones, la fosforilación oxidativa, la síntesis de nucleótidos y en la detoxificación celular.

Estas mismas propiedades químicas hacen del Fe un elemento tóxico si se encuentra en exceso en el interior de la célula. El Fe(II) libre puede participar en la reacción de Fenton, reaccionando con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para generar radicales hidroxilo ($\cdot OH$) altamente reactivos, los cuales dañan proteínas, lípidos y DNA. Por lo tanto, es de gran importancia mantener la homeostasis de Fe para asegurar el suministro pero a la vez prevenir la acumulación de un exceso de Fe. La deficiencia de Fe provoca anemia, mientras que la sobrecarga de Fe, como la observada en la patología denominada hemocromatosis hereditaria (HH), conlleva a daño celular y tisular permanente. (Hentze y Kühn, 1996; Roy y Enns, 2000).

El balance de Fe, es decir la diferencia entre la retención y los requerimientos de Fe, es mantenido principalmente a través de la regulación de la absorción en el intestino delgado y la conservación de las reservas corporales, ya que el cuerpo humano, a diferencia de lo que ocurre con otros nutrientes, carece de un mecanismo de excreción activo de Fe. Una pequeña cantidad de Fe, entre 1 y 2 mg es excretada por mecanismos inespecíficos como secreciones biliares y urinarias, exfoliación de enterocitos, descamación de la piel y menstruación, ninguno de los cuales es regulado por el nivel corporal de Fe. Al contrario, la absorción de Fe es altamente regulada y generalmente limitada a la recuperación del Fe perdido por estos mecanismos inespecíficos (Wessling-Resnick, 2000). Un hombre adulto posee 3 a 4 g de Fe corporal, de los cuales entre 2 y 2,5 g son incorporados a hemoglobina, formando parte del grupo hem, en los precursores eritroides y glóbulos rojos maduros, mientras que la mayor parte del resto es almacenado en el hígado (Andrews, 2000).

El Fe proveniente de la dieta está disponible como Fe hemínico (formando parte del grupo hem) o Fe no-hemínico (Fe no-hem), también llamado inorgánico, con sus dos estados de oxidación: Fe(II) y Fe(III). Las fuentes de Fe hem son la mioglobina y la hemoglobina encontradas en carnes rojas y las de Fe no-hem son vegetales, cereales y carne. El Fe hem representa sólo el 10-20% del Fe dietario en países desarrollados, mientras que el Fe no-hem abarca aproximadamente el 80%, pero debido a su mayor biodisponibilidad el Fe hem contribuye al 30% del Fe absorbido (Lombard y cols., 1997). La absorción intestinal de Fe, tanto hem como no-hem, ocurre en el intestino delgado, principalmente en el duodeno, siendo menor en el yeyuno y escasa en el ileon, y es llevada a cabo por células especializadas, polarizadas y absortivas, los enterocitos maduros de la microvellosidad. Sin embargo, la absorción de Fe hem no

compite con la del Fe no-hem indicando que ésta ocurre por vías diferentes (Raffin y cols., 1974).

La absorción intestinal de Fe no-hem consta de tres pasos: (1) entrada a través de la membrana apical de enterocitos duodenales, (2) translocación intracelular y (3) salida a través de la membrana basolateral (Chung y Wessling-Resnick, 2003). La entrada de Fe no-hem a través de la membrana apical de enterocitos está mediada por el transportador de metales divalentes DMT1 (Divalent Metal Transporter 1), también conocido como DCT1 (Divalent Cation Transporter 1) o Nramp2 (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 2), el cual transporta específicamente Fe de la forma reducida o ferroso (Fe(II)) utilizando el gradiente de potencial electroquímico de protones como fuente de energía (Gunshin y cols., 1997).

Dado que la mayor parte del Fe dietario se encuentra en la forma oxidada o férrica (Fe(III)), existe un mecanismo de reducción de Fe(III) a Fe(II) mediado por una ferri-reductasa duodenal denominada DcytB (Duodenal Cytochrome b), la cual utiliza ascorbato como donador de electrones (McKie y cols., 2001). El Fe que ingresa a los enterocitos es incorporado en la proteína de almacenaje Ferritina o transportado hacia la circulación sanguínea. La salida de Fe a través de la membrana basolateral ocurre a través del exportador IREG1 (Iron Regulated mRNA 1; McKie y cols., 2000), también llamado Ferroportina1 (Donovan y cols., 2000) o MTP (Metal Transporter Protein 1; Abboud y Haile, 2000). El Fe(II) exportado debe ser convertido a Fe(III) para ser unido a proteínas plasmáticas, esencialmente a la mayor proteína de transporte de Fe, Transferrina (Tf), para ser distribuido a células de tejidos periféricos que expresan el

Receptor de Transferrina (RTf). Esta conversión es catalizada por una ferroxidasa multi-cobre llamada Hefestina (Vulpe y cols., 1999).

La Transferrina (Tf) puede unir reversiblemente dos átomos de Fe(II) con alta afinidad al pH neutro de la sangre. La Tf diférrica se une a su receptor en la superficie celular y el complejo RTf-Tf es internalizado mediante endocitosis mediada por receptor. Dentro de endosomas, el Fe(III) es liberado debido al pH ácido y luego de ser reducido a Fe(II) puede salir hacia el citosol a través de DMT1 para formar parte del Fe intracelular. La apo-Tf unida aún a su receptor regresa a la superficie celular y es liberada a la circulación para su reutilización (Crichton y cols., 2002).

La expresión de estas proteínas claves en el metabolismo de Fe es regulado por los niveles intracelulares de Fe mediante el sistema IRE/IRP (Iron Responsive Element/Iron Regulatory Protein). Las proteínas reguladoras de Fe o IRPs (IRP1 e IRP2) son proteínas citosólicas que pueden unirse de manera específica a unas estructuras en forma de horquilla en los mRNAs llamadas elementos de respuesta a Fe o IREs, las que se encuentran presentes en las regiones 5' o 3' no traducidas de varios mRNAs que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de Fe, tales como DMT1, RTf y Ferritina. La actividad de unión de IRP a los IREs aumenta cuando los niveles de Fe intracelular disminuyen. Cuando las IRP se unen a los IREs situados en la región 5' de un mRNA, el resultado es una inhibición de la traducción, lo que ocurre en el caso de Ferritina e IREG1, debido a que a bajos niveles de Fe no es apropiado su almacenaje ni salida de la célula. Si los IREs se encuentran en la región 3' del mensajero, la unión de IRPs provoca una estabilización del mRNA aumentando los niveles de proteína. DMT1 y TfR poseen IREs en la región 3' del mRNA, por lo que su

expresión aumenta en respuesta a bajos niveles de Fe. Cuando el Fe intracelular aumenta, la unión de IRP a IRE disminuye, aumentando la expresión de ferritina y IREG1 y disminuyendo la de DMT1 y TfR (Eisenstein, 2000).

Absorción intestinal de Fe hemínico

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

La molécula de hem es un tetrapirrol cuadrado plano, en que los cuatro anillos pirrólicos se encuentran unidos por puentes meteno. La conjugación del macro-ciclo tetrapirrólico le otorga el color y la fluorescencia que caracteriza a las porfirinas. Las moléculas de porfirina por si mismas no unen oxígeno ni participan en reacciones oxidativas ni en procesos de transferencia de electrones, estas propiedades les son conferidas al unir un metal de transición divalente a través de dos átomos de nitrógeno imino (=N-) y dos nitrógenos pirrólicos (-NH₂-). La protoporfirina ferrosa (Fe(II)-PP) es rápidamente oxidada a protoporfirina férrica (Fe(III)-PP), la cual tiene carga positiva y es generalmente aislada como sal en la forma de hemina (Figura 1; Maines, 1997).

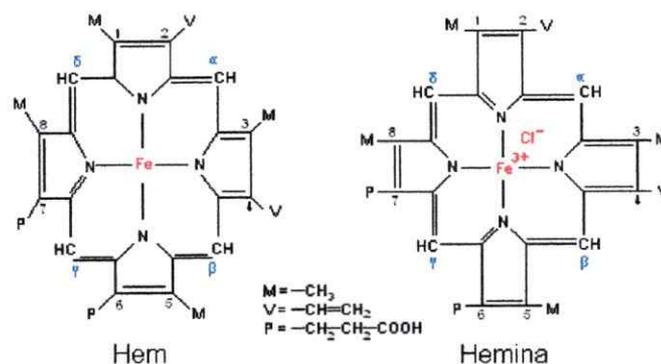


Figura 1. Estructuras de las moléculas de hem y hemina. La molécula de hem es un tetrapirrol cuadrado plano con sus anillos pirrólicos unidos por puentes meteno (α , β , γ y δ) y que contiene un átomo de Fe central. La hemina es la forma oxidada del hem (Modificada de Kumar y Bandyopadhyay, 2005).

La absorción intestinal de Fe hem involucra tres pasos: (1) captación apical de la molécula de hem desde el lumen, (2) catabolismo dentro del enterocito y liberación del Fe y (3) salida del Fe hacia la circulación (Oates y West, 2006).

El grupo hem es liberado de la mioglobina y hemoglobina por enzimas pancreáticas en el lumen intestinal e ingresa a los enterocitos absorptivos como el anillo metalo-porfirínico intacto. Primero, la molécula de hem se uniría a la membrana apical y sería internalizada, para luego aparecer en vesículas citoplasmáticas. Se han propuestos tres diferentes mecanismos por los cuales la FePP podría atravesar la membrana apical: endocitosis mediada por receptor (Galbraith y cols., 1985), difusión pasiva a través de la membrana debido a la naturaleza lipídica del hem (Light y Olson, 1990) y entrada por transporte activo, saturable y dependiente de la temperatura, indicativo de un transportador (Worthington y cols., 2001; Uc y cols., 2004).

Shayeghi y cols. (2005), clonaron y caracterizaron un transportador intestinal de hem en el duodeno de ratón, al cual denominaron HCP1 (Hem Carrier Protein 1). El gen de HCP1 de ratón contiene cinco exones, los cuales comprenden 1.942 pb, está localizado en el cromosoma 11B5 y codifica para una proteína de 54 kDa con 459 aminoácidos. El gen humano contiene 2.097 pb, está ubicado en el cromosoma 17q11.1 y codifica para una proteína de 446 aminoácidos de aproximadamente 50 kDa. La proteína es altamente hidrofóbica con nueve dominios transmembrana predichos, y su secuencia aminoacídica posee un 22% de similitud a los transportadores de tetraciclina bacterianos, miembros de la familia MFS (Major Facilitator Superfamily). El mRNA de HCP1 no posee IREs ni motivos de unión a hem conocidos.

Al inyectar oocitos de *Xenopus* con cRNA de HCP1, Shayeghi y cols., observaron un aumento de 2 a 3 veces en la absorción de hem, aumento similar al obtenido al infectar células HeLa con adenovirus-HCP1, y una selectividad para el transporte de hem pero no para tetraciclina o Fe no-hem. De manera interesante, la expresión duodenal de HCP1 no parece estar regulada por la deficiencia o por la sobrecarga sistémica de Fe en ratón. Al contrario, al exponer ratones a una condición de hipoxia, lo cual incrementa la absorción de Fe, provoca una marcada inducción del mRNA de HCP1 en el duodeno. Sin embargo, el estatus de Fe corporal sí parece jugar un rol en la regulación post-traducciona de HCP1, ya que en ratones controles HCP1 se localiza tanto en la membrana apical como en el citoplasma, mientras que en ratones deficientes de Fe se observa un marcado aumento de la proteína en la membrana citoplasmática de enterocitos duodenales y una fuerte disminución en el citoplasma. Lo contrario ocurre en ratones cargados con Fe, HCP1 se acumula en el citoplasma.

Este transportador se expresa en altos niveles en células Caco-2, -un modelo de epitelio intestinal-, y se localiza predominantemente en la membrana plasmática aunque también se observa su presencia en estructuras vesiculares. Cuando HCP1 es sobreexpresado en estas células la absorción de hem aumenta modestamente, posiblemente debido a la alta expresión endógena y a la existencia de un mecanismo regulatorio que prevenga la citotoxicidad causada por un exceso en la absorción de hem (Latunde-Dada y cols., 2006).

A pesar de las evidencias que relacionan a HCP1 con el transporte de hem, Qiu y cols. (2006), han propuesto que la función principal de HCP1 sería la de un transportador intestinal de folato, y que constituiría la base molecular de la patología denominada mala-absorción hereditaria de folato.

Una vez dentro de la célula, el hem es degradado por la enzima microsomal Hem oxigenasa (HO; EC 1.14.99.3) con la producción de CO, biliverdina IX α y Fe(II) libre (Figura 2). Biliverdina IX α es un tetrapirrol lineal que es rápidamente reducido al pigmento biliar bilirrubina IX α por la enzima biliverdin IX α reductasa (BVR; Tenhunen y cols., 1968; Raffin y cols., 1974). El Fe(II) liberado ingresa al pool de Fe intracelular, compitiendo con el Fe no-hem, y compartiendo los mismos mecanismos de salida hacia la circulación a través de IREG1.

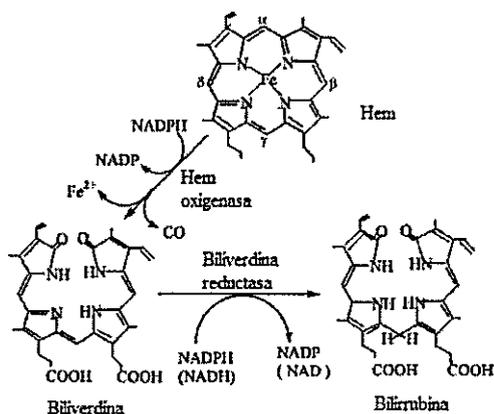


Figura 2. Degradación enzimática del hem. El catabolismo del hem es llevado a cabo por la enzima microsomal Hem oxigenasa (HO). En la reacción se forma biliverdina y se libera CO y Fe. La biliverdina es transformada a bilirrubina por la enzima Biliverdina reductasa (Modificada de Kumar y Bandyopadhyay, 2005).

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

Todas la isoformas de HO catalizan la oxidación de hem utilizando NADPH, NADPH-citocromo P-450 reductasa, la cual transfiere un electrón desde NADPH a hem, y oxígeno molecular (O₂). Por cada molécula de hem oxidada se utilizan tres moléculas de O₂ y tres de NADPH. La HO se une al hem en una razón equimolar y el

clivaje oxidativo ocurre en el puente α -metano debido a regulación estérica, según la evidencia entregada por la estructura cristalina del complejo hem-HO (Maines, 1997).

Cable y cols. (1993), observaron que la expresión de *ho-1* en células Caco-2 es inducida por hem. Los niveles de HO-1 son regulados por su sustrato mediante un mecanismo molecular que involucra al represor transcripcional Bach1 (Figura 3). Bach1 es capaz de reprimir la transcripciones de genes blancos al formar un heterodímero con proteínas de la familia Maf y unirse a elementos de reconocimiento de Maf (MAREs), presentes en el gen de HO-1 al menos en una copia funcional. Hem es capaz de unirse a Bach1 en los motivos CP (Cisteína-Prolina) presentes en la proteína y regular negativamente la actividad de unión de Bach1-Maf a DNA, lo que anula la represión de la expresión de *ho-1* en presencia de su sustrato (Ogawa y cols., 2001; Sun y cols., 2002).

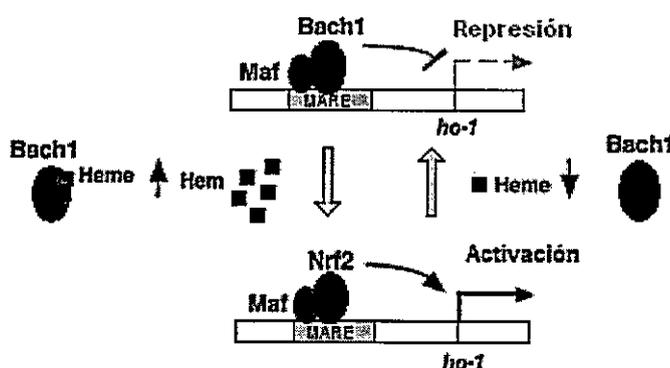


Figura 3. Regulación de la expresión de *ho-1*. A bajos niveles de hem, el represor transcripcional Bach1 se une a la secuencia MARE del gen *ho-1*, anulando la expresión. Al aumentar los niveles de hem, Bach1 es inactivado dejando el sitio MARE libre para la unión del activador transcripcional Nrf2, activándose la expresión de *ho-1* (Modificada de Shibahara, 2003)

La secuencia MARE también participa en la activación transcripcional de *ho-1* al unir al heterodímero formado por Nrf2 (NF-E2 Related Factor 2) y una proteína Maf (Alam y cols., 1999). Bach1 y Nrf2 competirían por la unión a la proteína Maf y a MARE, por lo que la disponibilidad de uno u otro factor determinaría si la transcripción de *ho-1* es reprimida o activada (Shibahara, 2003).

Por otro lado, Uc y cols. (2004) encontraron que el hem es capaz de pasar intacto desde un extremo a otro en células Caco-2, y sorpresivamente este transporte es mayor en la vía secretoria, es decir, desde el extremo basolateral hacia el apical. Además, la salida de hem de la célula, ya sea de manera absorbiva o secretoria, mostró ser un proceso activo, sugiriendo la presencia de un exportador.

Quigley y cols. (2004), describieron un exportador de hem en células eritroides, que es esencial para la eritropoyesis, denominado FLVCR (Feline Leukemia Virus, subgroup C Receptor), debido a que es el receptor de superficie celular del virus de leucemia felino subgrupo C y, al igual que HCP1, pertenece a la familia MFS. El cDNA de FLVCR codifica para una proteína de 560 aminoácidos con un peso molecular de 60 kDa. FLVCR se expresa en un amplio rango de tejidos y líneas celulares, y su expresión es particularmente elevada en células Caco-2, sugiriendo que puede participar en la exportación de hem en enterocitos, tanto del sintetizado endógenamente como del absorbido desde el lumen intestinal.

Uc y Britigan (2003), mostraron que en células Caco-2 la expresión de *ho-1* es inducible por hemina de manera dependiente de la dosis y del tiempo, pero no existen

hasta la fecha trabajos que estudien la expresión de *hcp1* o *flvcr* en respuesta a hem en estas células.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Dado que la absorción de Fe es un proceso regulado y que la expresión de la mayoría de los genes involucrados en el metabolismo de Fe es regulada por el estatus de Fe intracelular, y en el caso específico del metabolismo de Fe hem, la expresión de *ho-1* es regulada por hem, postulamos que "los niveles de mRNA del transportador intestinal de hem *hcp1* y del exportador de hem *flvcr* varían en respuesta al tratamiento con hierro hemínico en células Caco-2, de manera dependiente de la concentración y tiempo de exposición".

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles relativos de mRNA de *hcp1*, *flvcr* y *ho-1* en células Caco-2 sometidas a distintos estímulos con Fe hemínico mediante RT-PCR semi-cuantitativo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar el efecto de la concentración de hierro hemínico extracelular en los niveles de mRNA de *hcp1*, *flvcr* y *ho-1* en células Caco-2 sometidas a un estímulo agudo.

- b) Determinar el efecto de la concentración de hierro hemínico extracelular en los niveles de mRNA de *hcp1*, *flvcr* y *ho-1* en células Caco-2 sometidas a un estímulo crónico.

- c) Determinar el efecto del tiempo de estímulo con hierro hemínico extracelular en los niveles de mRNA de *hcp1*, *flvcr* y *ho-1* en células Caco-2.

- d) Determinar el efecto de la concentración de hierro no-hemínico extracelular en los niveles de mRNA de *hcp1*, *flvcr* y *ho-1* en células Caco-2 sometidas a un estímulo agudo.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 REACTIVOS

Generales: HCl, NaOH, NaCl, FeCl₃, NaHCO₃, NTA, KH₂PO₄, KOH, NADPH, EDTA-Na, BSA, PMSF, Tris base, cloroformo, etanol, hemina, biliverdina reductasa, hemoglobina de bovino, pepsina, ácido nítrico, isopropanol, Tritón X-100, inhibidores de proteasas.

Cultivo Celular: Medio Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium, tripsina-EDTA, fungizona/penicilina/estreptomycin, suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY).

Biología Molecular: Transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen), Agarosa Top Vision (Fermentas), Taq DNA Polimerasa (Invitrogen), bromuro de etidio (Gibco), 10x PCR Buffer (Invitrogen), MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), GTP, ATP, TTP, CTP 100 mM (Invitrogen), RNasa H (Invitrogen), TRIzol (Invitrogen), DEPC (Gibco), Marcador DNA 100 pb (Fermentas).

2.1.2 EQUIPOS

Centrífuga 5416 (Eppendorf), Centrífuga refrigerada (Vision), Centrífuga Spectrafuga 16M (Labnet), Espectrofotómetro UV-visible UV-1601 (Shimadzu), Termociclador 2720 (Applied Biosystems), Fuente de poder Power Station 300 (Labnet), Transluminador UV (Genesys), Incubadora con inyección de CO₂ (ShellLab), Campana de flujo laminar FASTER (Cientec), Bomba de vacío Rocker 300 (Mundolab), Baño termostático (Mettler), Placa calefactora (Scientific Products), Agitador/calefactor Nuovall (Thermolyne), Balanza Mettler PM 4600 (Delta Range), pHímetro (Oakton), Espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito (SIMAA 6100, Perkin Elmer).

2.1.3 MATERIALES DE CULTIVO

- Placas de cultivo de 6 pocillos, 35 mm diámetro, Orange Scientific (2030500).
- Botellas plásticas de cultivo, 40 mL (25 cm²), Orange Scientific (2010100).
- Pipetas plásticas desechables, 10 mL, Orange Scientific (PN10E1).
- Pipetas Pasteur plásticas estériles, 3 mL, TCL.
- Unidades de filtración desechables, tamaño de poro 0,2 µm, Orange Scientific (1520012).
- Unidades de filtración para bomba de vacío, tamaño de poro 0,2 µm, Steritop, Millipore.

2.1.4 MATERIAL BIOLÓGICO

Células Caco-2 (American Type Culture Collection HTB37, Rockville, MD). La línea celular Caco-2 es una de las líneas celulares más utilizadas en los estudios sobre Fe. Esta línea deriva de un adenocarcinoma de colon y presenta una diferenciación enterocítica espontánea *in vitro* al alcanzar confluencia. En cultivo forma una monocapa altamente polarizada y exhibe propiedades estructurales y funcionales de células epiteliales intestinales maduras, como microvellosidades apicales, uniones estrechas y la expresión de enzimas específicas de enterocitos (Álvarez-Hernández y cols., 1991). Estas células absorben, transportan y son sensibles al estatus de Fe. Se han llevado a cabo estudios de transporte de Fe (Follett y cols., 2002; Uc y cols., 2004) y regulación de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de Fe (Cable y cols., 1993; Tallkvist y cols., 2000; Uc y Britigan, 2003) utilizando estas células como modelo válido de epitelio intestinal.

2.2 METODOS

2.2.1 Cultivo celular. Células Caco-2 fueron cultivadas en medio Iscove's (bajo en Fe) suplementado con 10% SFB, aminoácidos no esenciales y 100.000 UI de penicilina/estreptomina y 25 mg/mL de fungizona. Las células fueron propagadas en botellas de 25 cm², se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/cm² y se crecieron por 7 días a 37 °C y 5% CO₂, alcanzando confluencia. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco cada 2 días. Luego de este período las células fueron tripsinizadas y resembradas en iguales condiciones.

2.2.2 Digestión de hemoglobina. Como fuente de Fe hemínico se utilizó el producto de una digestión parcial de hemoglobina de bovino, la cual presenta una relación de 3,3 mg Fe / mg hemoglobina. Se preparó un homogenizado de hemoglobina para una concentración final de 5 mM Fe en agua desionizada y se agregó HCl 6 N hasta alcanzar un pH de 2. Se agregó una solución de pepsina en HCl 0,1 N (0,5 % final) y se incubó durante 2 horas a 37 °C con agitación constante. Luego de finalizada la digestión se subió el pH a 6,5 usando NaOH 1 N. Se centrifugó a 2.500 rpm por 15 minutos y se rescató el sobrenadante, el cual se esterilizó por filtración antes de ser utilizado. El contenido de Fe en el digerido se determinó por medio de espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, para lo cual se mezcló una alícuota del digerido con un volumen igual de ácido nítrico 65 % y se incubó ON a 60 °C.

2.2.3 Obtención de células Caco-2 sometidas a distintos estímulos con Fe hemínico y no-hemínico. Células Caco-2 fueron crecidas en placas de seis pocillos

de 35 mm de diámetro en las mismas condiciones descritas en 2.2.1. Como fuente de hem se utilizó un digerido de hemoglobina (2.2.2) y como fuente de Fe no-hemínico se utilizó FeCl_3 -NTA en una relación molar 1:2. En cada caso, se agregó directamente la fuente de Fe al medio de cultivo en las concentraciones indicadas. El tiempo de estímulo corresponde a las horas o días que las células permanecieron expuestas a Fe antes de ser tratadas.

2.2.4 Extracción de RNA de células Caco-2. Se aisló RNA total de células Caco-2 utilizando reactivo TRIzol según las indicaciones del fabricante. Brevemente, células crecidas por 7 días en placas de 3,5 cm. de diámetro fueron lavadas dos veces con PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 4,3 mM, KH_2PO_4 1,4 mM, pH 7,3) y luego lisadas directamente en las placas agregando 1 mL de TRIzol. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min para permitir la disociación de los complejos núcleo-proteínas. El lisado fue traspasado a tubos Eppendorf de 1,5 mL y se agregaron 200 μL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se centrifugó a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. Aproximadamente el 50% de la fase acuosa fue traspasado a un nuevo tubo. Se agregaron 500 μL de isopropanol para precipitar el RNA y se centrifugó a 12.000 x g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado fue lavado con 1 mL de etanol 75% en H_2O -DEPC. Se centrifugó a 7.500 x g por 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el RNA fue resuspendido en 20 μL de H_2O -DEPC y guardado a -20 °C hasta ser utilizado.

2.2.5 Síntesis de cDNA a partir de RNA. 5 μg de RNA total fueron usados para obtener cDNA por transcripción reversa. Se preparó una mezcla con RNA y 0,5 μg primer oligo dT y se agregó H_2O -DEPC para un volumen final de 11 μL , e incubó a 70

°C por 5 min y luego a 4 °C por 1 minuto. Se agregaron 4 µl de Tampón de Reacción 5x y 2 µl de dNTPs 10 mM y H₂O-DEPC para un volumen final de 19 µl y se incubó a 37 °C por 5 min. Luego se agregó 1 µL de Transcriptasa Reversa MMLV y se incubó por 50 min adicionales a 42 °C. La reacción fue terminada a 70 °C por 15 min. Finalmente, se agregó 1 µl de RNAsa H, y se incubó a 37 °C por 20 min. El cDNA fue guardado a -20 °C hasta ser utilizado.

2.2.6 PCR semi-cuantitativo para *ho-1*. 1 µL de cDNA fue utilizado para amplificar el gen *ho-1* mediante PCR usando la enzima Taq Polimerasa. Los partidores usados fueron: 5'-cttcttcaccttccccaaca-3' y 5'-gctctggctctgggtcat-3', los cuales amplifican un fragmento de 201 pb. Se preparó una mezcla de 2 µL de Buffer de PCR 10x (1x final), 0,8 µL de MgCl₂ 50 mM (2 mM final), 0,4 µL de dNTPs 10 mM (0,2 mM final), 0,4 µL de cada partidor (0,2 µM final), 1 µL de Taq Polimerasa (0,2 U) y 13,8 µL de ddH₂O estéril (20 µL volumen final de reacción). El programa utilizado comprende un ciclo de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C y 20 seg a 72 °C y una extensión final por 5 min a 72 °C. Para la normalización y como control interno se realizó un PCR de *β-actina* con los partidores 5'-ggacttcgagcaagagatgg-3' y 5'-gactcgtcactactcctgcttg-3', y un protocolo igual al usado para *ho-1*, generándose un fragmento de 432 pb.

2.2.7 PCR semi-cuantitativo para *hcp1*. 1 µL de cDNA fue utilizado para amplificar el gen *hcp1* mediante PCR en las mismas condiciones que para *ho-1*. Los partidores usados fueron: 5'-aggccctagtgctccgtttt-3' y 5'-gtcgagtcgtagaggggatg-3', los cuales amplifican un fragmento de 566 pb. El programa usado comprende un ciclo de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C y 40 seg a 72 °C y una extensión final por 5 min a 72 °C. Nuevamente se normalizó por *β-actina*.

2.2.8 PCR semi-cuantitativo para *flvcr*. 1 μ L de cDNA fue utilizado para amplificar el gen *flvcr* mediante PCR en las mismas condiciones que para *ho-1*. Los partidores usados fueron: 5'-ggtatccaccaagtcagg-3' y 5'-ccgagataagaaacaccg-3', los cuales amplifican un fragmento de 266 pb. El programa usado comprende un ciclo de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 50 °C y 20 seg a 72 °C y una extensión final por 5 min a 72 °C. Se normalizó por β -actina.

2.2.9 Análisis de los productos de RT-PCR. Los productos de RT-PCR se cargaron simultáneamente con su estándar de β -actina en un gel de agarosa al 3% en TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0). Los niveles de expresión se analizaron por densitometría utilizando el software Imagen J (NIH Image/Scion Image, disponible en <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>), definiendo una unidad arbitraria (UA) como la razón entre la densidad de banda de *hcp1*, *ho-1* o *flvcr* y la de β -actina y se consideró la expresión de las células controles (sin estímulo) como la expresión basal.

2.2.10 Extractos celulares y determinación del contenido de Fe interno. Para la obtención de un extracto celular las células Caco-2 fueron lavadas 3 veces con PBS 1x y luego soltadas de los pocillos de cultivo con 1 mL de Tris salino-EDTA (Tris-HCl 40 mM, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM, pH 7,5) e incubadas a 37 °C por 10 min. Las células se traspasaron a tubos Eppendorf de 1,5 mL, centrifugadas a 14.000 rpm por 30 seg y se trataron con 50 μ L de buffer de lisis por cada 10^6 células (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, BSA 0,2%, Tritón X-100 1%, PMSF 2 μ M e inhibidores de proteasas 1%). La mezcla fue incubada en hielo por 15 minutos y centrifugada a máxima velocidad. Se traspasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se diluyó con el

mismo volumen de Tris salino. Se tomaron alícuotas de 5 μL en duplicado para determinación de proteínas y 50 μL para la determinación de Fe interno. Las muestras fueron guardadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizadas. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry y cols. (1951), y el contenido de Fe interno se determinó por medio de espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito.

2.2.11 Medición de la actividad de Hem oxigenasa. Para determinar la actividad HO total en células Caco-2 se utilizaron 250 μg de extracto de celular, los cuales se incubaron con 600 μL de Buffer B (KH_2PO_4 100 mM, pH 7,4 ajustado con KOH 1 M), 100 μL de hemina 150 μM , 100 μL de biliverdina reductasa (extracto crudo de hígado de rata) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 μL de NADPH 10 mM por 1 hora a 37°C en oscuridad. La bilirrubina se extrajo en agitación con 1 mL de cloroformo a temperatura ambiente por 1 hora. Se midió la absorbancia a 530 nm ($\epsilon_{\text{bilirrubina}} = 43,5\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). La actividad enzimática se expresó como nmoles de bilirrubina $\cdot\text{mg}$ proteína total $^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$.

2.2.12 Análisis estadístico. Las variables fueron medidas en duplicados y los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. Análisis de ANOVA de una vía y Test de Student fueron usados para las comparaciones entre cada tratamiento. Los resultados se expresaron como promedios \pm SD. Las diferencias fueron consideradas significativas si $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis de la expresión de *hcp1*, *flvcr* y *ho-1* en respuesta a un estímulo de Fe hemínico agudo.

Con la finalidad de determinar el efecto de un estímulo agudo de hem en la expresión de los genes implicados en su metabolismo, células Caco-2 fueron incubadas por 24 horas con diferentes concentraciones de hem extracelular a partir de un digerido de hemoglobina y se semi-cuantificaron los niveles de mRNA de *ho-1*, *hcp1* y *flvcr*, según lo descrito en Materiales y Métodos. Para corroborar que la hemoglobina es absorbida y utilizada como fuente de Fe por las células se midió el contenido de Fe interno, el cual efectivamente aumentó al incrementar la concentración de hem extracelular, desde $1,65 \pm 0,10$ nmoles Fe/mg proteína para el basal hasta $5,04 \pm 0,60$ para una concentración de 50 μM de Fe hem extracelular (ANOVA una vía, F: 29,1; $p < 0,001$; Figura 4).

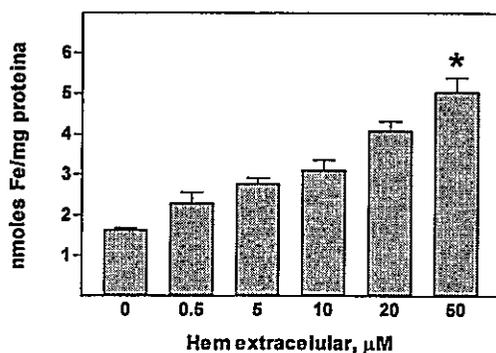


Figura 4. Contenido de Fe interno en células Caco-2 tratadas por 24 horas con concentraciones crecientes de hem. El nivel de Fe intracelular total en células incubadas por 24 hrs con distintas concentraciones de hem fue determinado a partir de extractos celulares por medio de espectrofotometría de absorción atómica. (Promedio \pm DE. n=3 experimentos independientes en duplicado; ANOVA una vía, F: 29,1; * $p < 0,001$).

Previamente han sido publicado estudios que demuestran que la expresión de *ho-1* aumenta en presencia de hem (Cable y cols., 1993) y que este aumento es dependiente de la concentración (Uc y Britigan, 2003). El análisis densitométrico de las bandas obtenidas por RT-PCR mostró que la expresión de *ho-1* en células Caco-2 responde de manera dependiente de la dosis de hem, observándose un aumento a mayores concentraciones (Figura 5A, B). Entre el basal y 50 μM hem hay una diferencia de $1,75 \pm 0,23$ veces en la expresión (ANOVA una vía, $F: 5,34; p < 0,01$). Este aumento en los niveles de mensajero se correlacionan con un incremento en la actividad de la enzima HO-1 (Figura 5C).

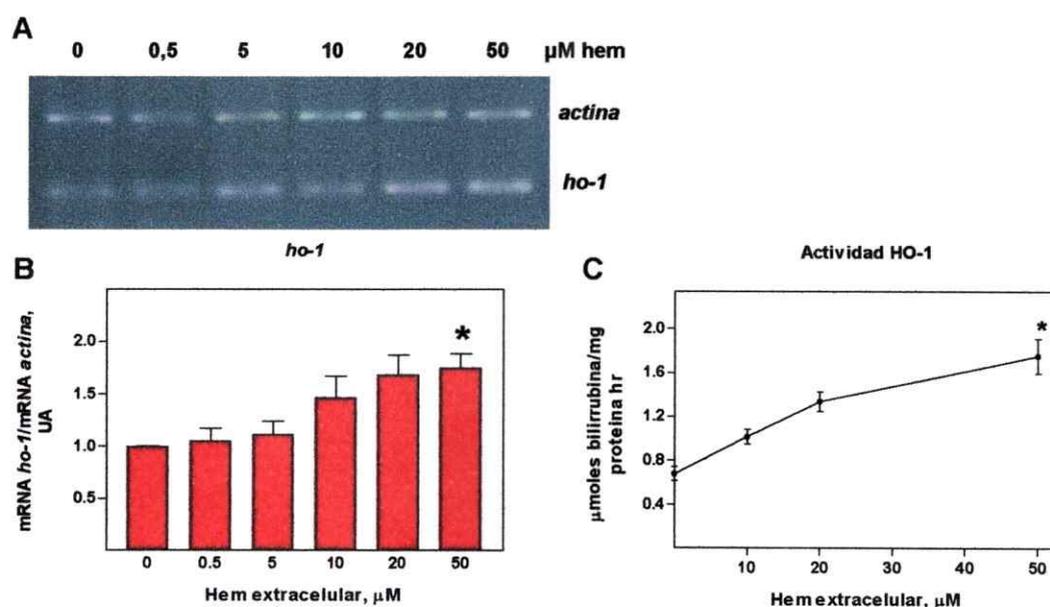


Figura 5. Expresión relativa de *ho-1* y actividad enzimática en células Caco-2 sometidas a distintas concentraciones de hem por 24 hrs (A). Electroforesis en gel de agarosa 3% representativa de RT-PCR semi-cuantitativo para *ho-1* estandarizado por β -actina. **(B).** Análisis densitométrico de A. **(C).** Actividad enzimática de HO-1 en función de la concentración de hem extracelular. (Promedios \pm DE; $n=3$, duplicados; ANOVA una vía, $F: 5,34; * p < 0,01$).

La expresión de *hcp1* no mostró una variación tan marcada como la observada para *ho-1*, si bien parece que el nivel de expresión aumentó a mayor concentración de hem extracelular (Figura 6A). La expresión aumentó hasta alcanzar un máximo a 20 μM hem, con un incremento cercano a 1,4 veces la expresión basal, pero a diferencia de *ho-1* disminuyó a 50 μM hem llegando a un nivel cercano al basal. Sin embargo, esta variación no fue estadísticamente significativa.

En el caso de *flvcr*, el patrón de variación de la expresión es similar al observado para *ho-1*, su expresión aumentó junto con la concentración de hem extracelular, alcanzando una inducción de $2,12 \pm 0,44$ veces la expresión basal para una concentración de 20 μM (ANOVA una vía, F: 6,56; $p < 0,01$), al igual que *hcp1*, presenta una disminución de la expresión para 50 μM . (Figura 6B).

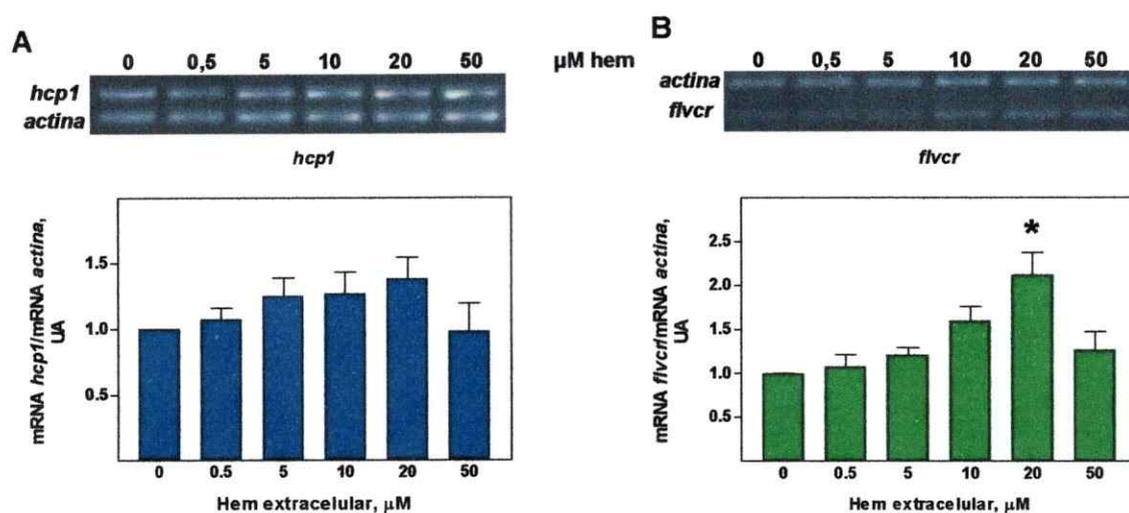


Figura 6. Respuesta de *hcp1* y *flvcr* a distintas concentraciones de hem. Células Caco-2 fueron incubadas por 24 hrs con 0-50 μM hem y se analizaron densitométricamente los productos de RT-PCRs semi-cuantitativos para *hcp1* y *flvcr*. Geles representativos y expresión relativa de: **(A)** *hcp1* y **(B)** *flvcr*; en función de la concentración de hem. (Promedios \pm DE; $n=3$, duplicados, ANOVA una vía, F: 6,56; * $p < 0,01$)

Estos resultados sugieren que la expresión de *ho-1* y *flvcr* pero no la de *hcp1* es inducible por hem y esta inducción es dependiente de la concentración.

3.2 Análisis de la expresión de *hcp1*, *flvcr* y *ho-1* en respuesta a un estímulo de Fe hemínico crónico.

Al someter a células Caco-2 a un estímulo de distintas concentraciones de hem por 24 hrs, los niveles relativos de mRNA de *ho-1*, *hcp1* y *flvcr* se ven afectados de manera dependiente de la concentración. Para determinar si esta variación se mantiene cuando el estímulo es más prolongado, las células se incubaron por 5 días con las mismas concentraciones de Fe hem extracelular que en el caso anterior y se determinaron los niveles de expresión relativos de *ho-1*, *hcp1* y *flvcr*. Al mantener las células bajo estas condiciones, el Fe intracelular aumentó junto con la concentración de hem, alcanzando valores mayores que los observados con la incubación de 24 hrs, desde $1,64 \pm 0,40$ en el basal a $6,71 \pm 0,52$ nmoles Fe/mg proteína a $50 \mu\text{M}$ de Fe hem externo (ANOVA una vía, F: 47,8; $p < 0,001$; Figura 7A).

En este caso, la expresión de *ho-1* perdió el patrón observado con anterioridad, volviéndose relativamente constante independiente de la concentración de hem externo y sin variación significativa (Figura 7B). *Hcp1* tampoco mostró variaciones significativas a ninguna concentración de Fe hem extracelular (Figura 7C). Para *flvcr* únicamente se obtuvo una inducción significativa a $20 \mu\text{M}$, con una variación de sólo $1,55 \pm 0,11$ veces la expresión basal comparada con la obtenida a las 24 hrs de incubación (Figura 7D).

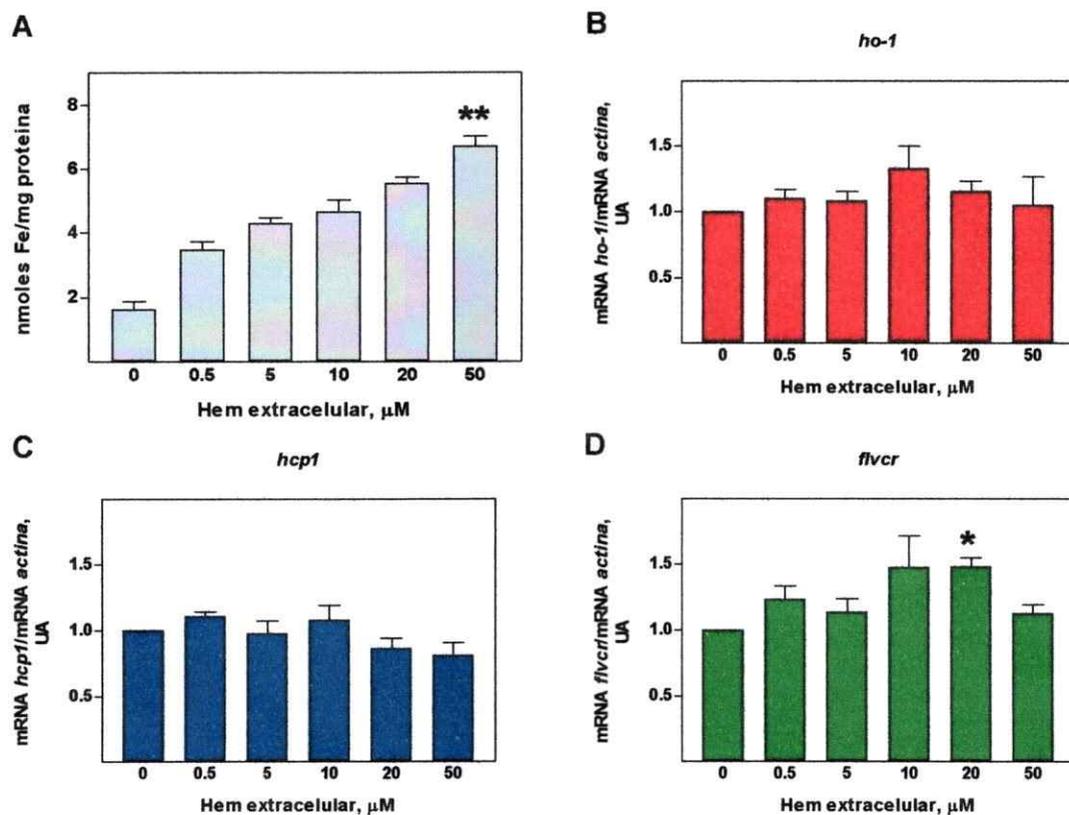


Figura 7. Contenido de Fe interno y expresión de *ho-1*, *hcp1* y *flvcr* en células Caco-2 incubadas por 5 días con hem. (A) Fe intracelular total aumenta a mayores concentraciones de hem. La expresión de (B) *ho-1* y (C) *hcp1* es relativamente constante para cualquier concentración de hem. (D) *Flvcr* aún presenta una inducción significativa a 20 μM hem (Promedios \pm DE; $n = 3$, duplicados, t-Student: * $p < 0,05$; ANOVA una vía, $F: 47,8$; ** $p < 0,001$)

3.3 Análisis de la expresión de *hcp1*, *flvcr* y *ho-1* en respuesta al tiempo de estímulo con Fe hemínico.

Los genes involucrados en el metabolismo de hem presentaron un patrón de expresión diferente dependiendo de si el estímulo con diferentes concentraciones de hem es dado por 24 hrs o por 5 días, por lo que el tiempo de exposición parece jugar un papel importante en la regulación de la expresión. Para estudiar como se comporta la expresión de *ho-1*, *hcp1* y *flvcr* dependiendo del tiempo de estímulo, células Caco-2 fueron tratadas con una misma concentración de hem extracelular (20 μ M), por diferentes tiempos. Como es de esperar, a medida que el tiempo de exposición a hem aumenta, las células presentan mayor contenido de Fe interno, siendo a 50 μ M de $6,55 \pm 0,75$ nmoles Fe/mg proteína, mientras que el nivel basal sólo alcanzó a $2,57 \pm 0,16$. (ANOVA una vía, F: 35,04; $p < 0,001$; Figura 8).

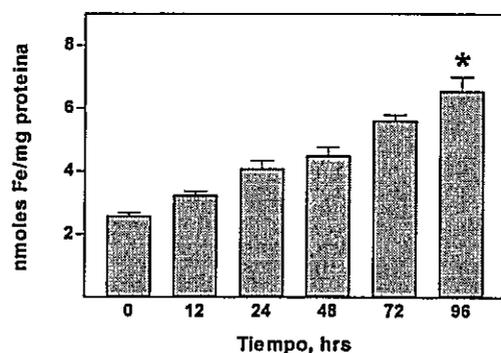


Figura 8. Niveles de Fe intracelular en células Caco-2 tratadas por diferentes tiempos con 20 μ M hem. Aumento del contenido de Fe intracelular con el tiempo en células expuestas a hem. (Promedios \pm DE; n = 3, duplicados; *: ANOVA una vía, F: 35,04; $p < 0,001$)

Uc y Britigan (2003) reportaron que *ho-1* alcanza un máximo de expresión a las 12 hrs de exposición a hem para luego ir disminuyendo a medida que aumenta el tiempo de exposición. Este mismo comportamiento se observó en este estudio, la expresión de *ho-1* alcanzó un valor máximo cuando las células fueron tratadas por 12 hrs, llegando a ser de $1,96 \pm 0,30$ veces la expresión basal (ANOVA una vía, F: 3,90; $p < 0,05$), luego de lo cual la expresión comenzó a declinar y se volvió relativamente constante para tiempos superiores a 48 hrs (Figura 9A). Los niveles de expresión se correlacionan con la actividad de HO (Figura 9B).

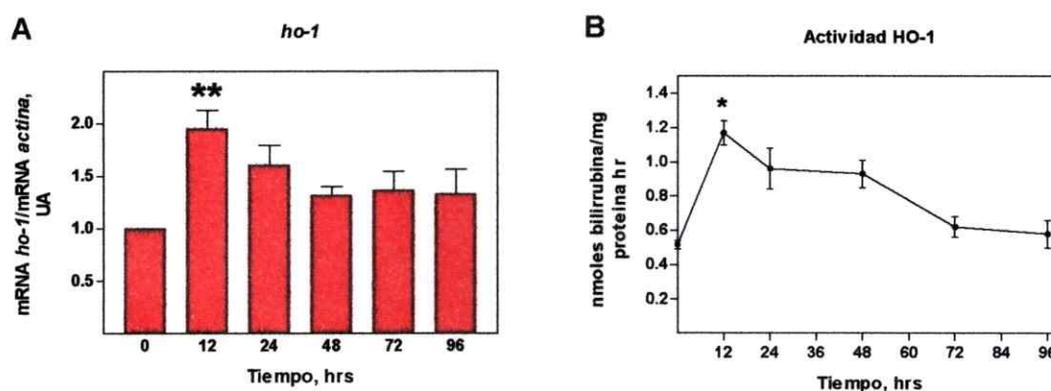


Figura 9. Relación entre la expresión de *ho-1* y la actividad HO según el tiempo de exposición a hem. (A) Niveles relativos de mRNA de *ho-1* en células Caco-2. (B) Actividad de Hem oxigenasa intracelular. (Promedios \pm DE; n = 3, duplicados; t-Student: * $p < 0,05$; ANOVA una vía, F: 3.90; ** $p < 0.05$)

A diferencia de *ho-1*, a las 12 hrs de tratamiento *hcp1* no presentó una variación de su expresión comparado con el nivel basal. En cambio, cuando el tiempo de

estímulo fue de 24 hrs se obtuvo la mayor expresión, sin embargo no fue estadísticamente significativa. Luego, la expresión decayó paulatinamente a medida que el tiempo de exposición aumentó (Figura 10A). Para *flvcr* en cambio, la respuesta es muy similar a la observada para *ho-1*, hay un aumento significativo de la expresión a las 12 y 24 hrs, para luego disminuir a niveles basales (ANOVA una vía, F: 3,64; $p < 0,05$). Cuando el estímulo fue dado por 12 hrs la expresión aumentó en $2,36 \pm 0,53$ veces, mientras que cuando fue de 24 hrs la expresión fue de $2,01 \pm 0,44$ veces con respecto a la expresión basal (Figura 10B). Estos resultados muestran que la expresión de *ho-1* y *flvcr* es dependiente del tiempo de exposición a hem, no así la de *hcp1*.

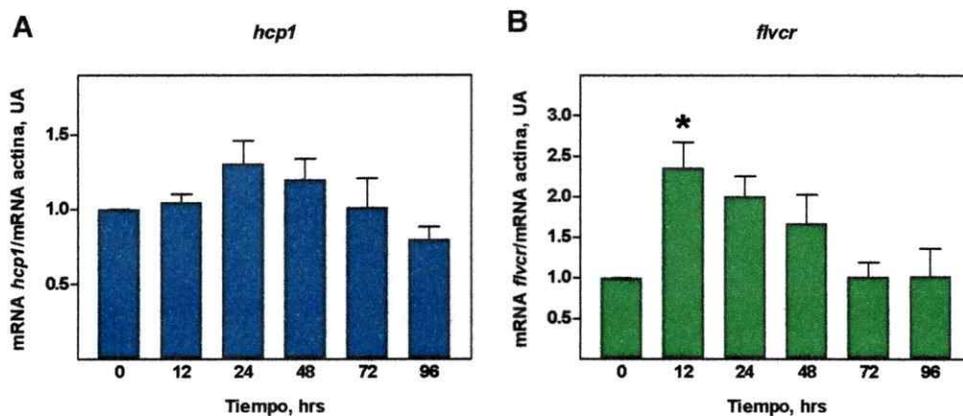


Figura 10. Análisis de la expresión de *ho-1* y *flvcr* frente al tiempo de estímulo con hem. (A) Expresión de *hcp1*; (B) La expresión de *flvcr* alcanza un máximo cuando el tiempo de exposición a hem es de 12 hrs (Promedios \pm DE; n = 3, duplicados; ANOVA una vía, F: 3.64; * $p < 0,05$)

3.4 Análisis de la expresión de *hcp1*, *flvcr* y *ho-1* en respuesta a un estímulo de Fe no-hemínico.

Los resultados anteriores muestran que al incubar células Caco-2 con hem se produce un efecto en la expresión de los genes *ho-1* y *flvcr*, y que este efecto es dependiente de la concentración y del tiempo por el cual las células son expuestas al estímulo. En el caso de *ho-1*, se sabe que el aumento en la expresión inducida por hem es debido a un efecto directo de la molécula, mediante la inactivación del represor transcripcional Bach1. Sin embargo, no se ha reportado que en el gen *flvcr* existan motivos similares a los presentes en el promotor de *ho-1* que permitan la regulación por hem, por lo que es posible que la variación de los niveles de mRNA no sea un efecto directo, sino que producto del aumento del Fe intracelular, el cual es liberado por la acción de HO-1 sobre la molécula de hem. Para determinar si el Fe no-hemínico es capaz de alterar la transcripción de *hcp1* y *flvcr* se incubaron células Caco-2 con distintas concentraciones de Fe-NTA por 24 hrs y se determinó el efecto en la transcripción de la misma forma que en los casos anteriores. Estas células aumentan su contenido de Fe interno a medida que la concentración de Fe extracelular es mayor (ANOVA una vía, F: 64,03; $p < 0,001$; Figura 11A). La incubación con Fe no-hemínico no mostró efectos significativos a ninguna concentración en la expresión de *ho-1* comparado con las células controles (Figura 11B), tal como se ha reportado anteriormente (Latunde-Dada y cols., 2006). Tanto para *hcp1* como para *flvcr* se obtuvo un resultado similar, no existe una variación significativa de su expresión para ninguna concentración de Fe, a pesar de para *flvcr* se observa un aumento a 10-20 μM Fe (Figura 11C y D).

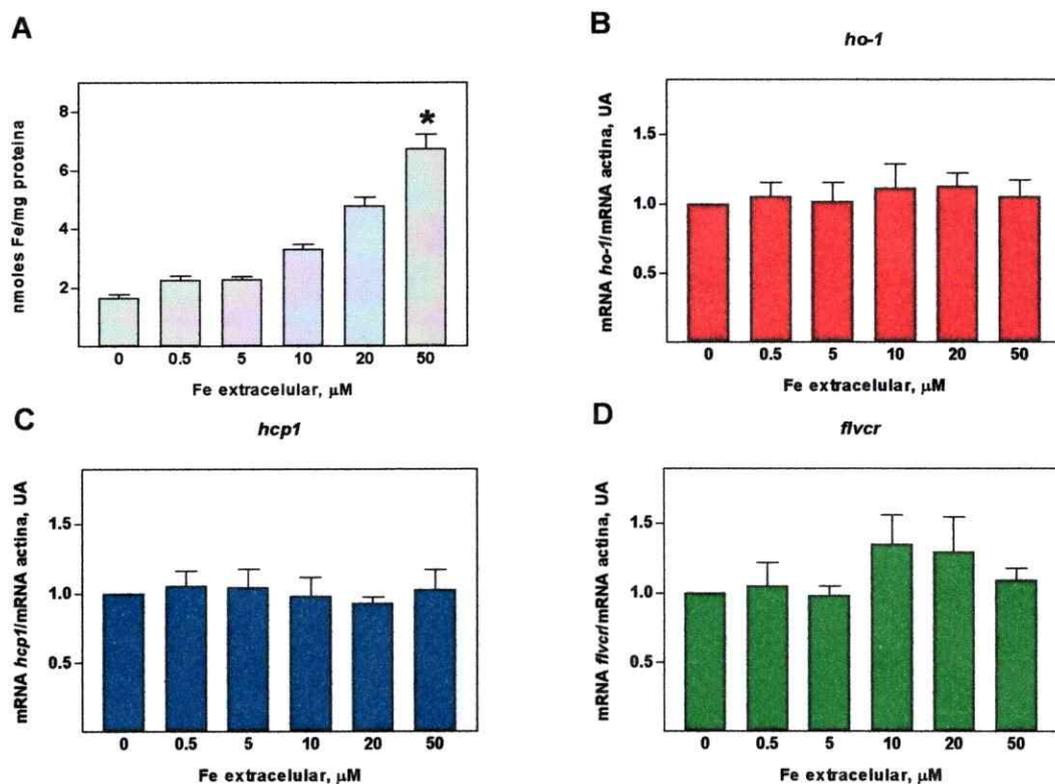


Figura 11. Efecto del Fe no-hem en la expresión de *ho-1*, *hcp1* y *flvcr* en células Caco-2. (A) Incremento del Fe interno luego de una incubación con concentraciones crecientes de Fe inorgánico. La expresión de (B) *ho-1*; (C) *hcp1* y (D) *flvcr* no varían significativamente a ninguna concentración de Fe. (Promedios \pm DE; $n = 3$, duplicados; ANOVA una vía, $F: 64,03$; $* p < 0,001$).

4. DISCUSIÓN

El hem dietario es una fuente importante de Fe y su absorción difiere de la del Fe inorgánico. El modelo de absorción intestinal de hem aceptado actualmente (Oates y West, 2006) propone que la captación ocurre por transporte pasivo a través de la membrana, endocitosis mediada por receptor o a través de un transportador. La degradación de hem y la liberación de Fe, es llevada a cabo por la enzima microsomal hem oxigenasa (HO) y la fracción no degradada es transportado desde las células enterocíticas a través de un exportador en la membrana de la membrana basolateral (Figura 12). Si bien el rol de HO-1 ha sido ampliamente estudiado, poco se conoce acerca de los procesos implicados en el transporte de hem a través de la mucosa intestinal. El reciente descubrimiento de las proteínas de membrana HCP1 y FLVCR ha contribuido al esclarecimiento de los mecanismos moleculares que subyacen al transporte de hem. Sin embargo, su real participación en el proceso de absorción intestinal aún no ha sido lo suficientemente estudiada.

En el presente trabajo estudiamos la expresión de los genes de *hcp1* y *flvcr* junto al de la *ho-1* en células Caco-2 y su respuesta frente a estímulos de Fe hemínico, en base a la hipótesis de que las proteínas involucradas en el metabolismo intestinal de hem presentan algún tipo de regulación que permita mantener los niveles adecuados de Fe corporal, al igual como ocurre en el caso de proteínas que participan en la absorción de Fe inorgánico, y esta regulación puede darse a nivel transcripcional.

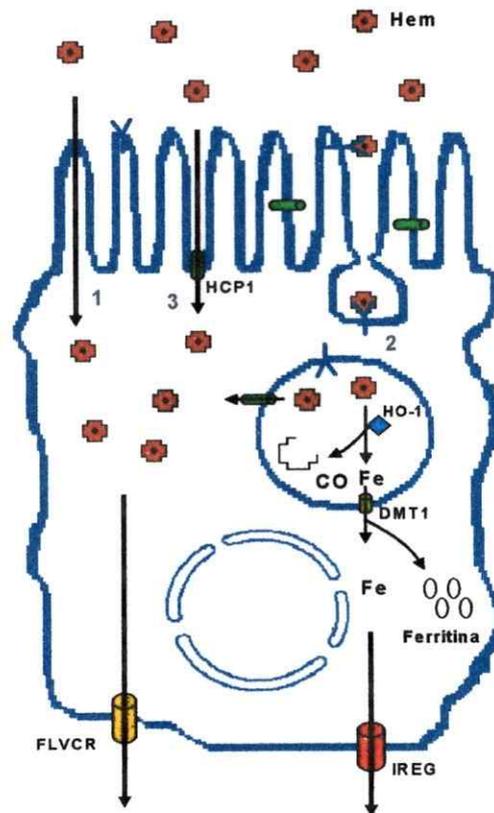


Figura 12. Modelo propuesto para la absorción y transporte intestinal de hem. El Fe hemínico puede ser captado por la célula intestinal por (1) difusión a través de la membrana, (2) endocitosis mediada por receptor o (3) a través del transportador HCP1. En el interior de la célula, el hem puede ser convertido a biliverdina, CO y Fe(II) libre por la enzima microsomal HO-1 o transportarse intacto hacia la circulación a través del exportador de la membrana basolateral FLVCR.

4.1 Contenido intracelular de Fe en células Caco-2 expuestas a hem.

Gran parte de los estudios relativos a la absorción de Fe hemínico utilizan hemina como fuente de Fe hem. Sin embargo, el uso de hemina presenta dificultades debido a su insolubilidad y la formación de agregados. Además, se ha descrito que la absorción es más eficiente cuando el hem se encuentra en presencia de globina que cuando está solo (Follett y cols., 2002). Por esta razón decidimos utilizar como fuente de hem un digerido parcial de hemoglobina, el cual se asemeja más a la condición fisiológica de absorción a la que están sometidas las células intestinales. Además, para todos los experimentos llevados a cabo, las células fueron crecidas en deficiencia de Fe, por lo que se esperaba una alta absorción de hem. Dado que las células Caco-2 incrementan su contenido interno de Fe cuando aumenta i) la concentración de hem en el medio de cultivo y ii) el tiempo de incubación (Figura 4, 7A y 8A) podemos afirmar que el digerido de hemoglobina es absorbido y utilizado como fuente de Fe hem.

4.2 Expresión de *hcp1*, *flvcr* y *ho-1* en respuesta a la concentración de Fe hemínico.

Los resultados obtenidos mediante RT-PCR semi-cuantitativo muestran que al incubar células con Fe hem por 24 hrs, la expresión de *ho-1* y *flvcr* varían de una manera dependiente de la concentración, mientras que *hcp1* no presenta una variación significativa de los niveles de mRNA a ninguna de las concentraciones estudiadas.

Con respecto a *ho-1*, este resultado concuerda con los publicados en estudios previos, los cuales demuestran que en células Caco-2 *ho-1* se induce en presencia de hem y que a mayor concentración mayor es su inducción (Cable y cols., 1993; Uc y Britigan, 2003). El mecanismo molecular que subyace a esta inducción está caracterizado e involucra la unión de hem al represor transcripcional Bach1, cuya función se inactiva permitiendo la activación de la transcripción. Una regulación de tipo post-traducciona ha sido también propuesta para HO-1, la cual además de sufrir un aumento en la transcripción, cambia de una localización perinuclear a una cercana a la membrana plasmática en presencia de hem (Mendiburo, 2006). La inducción de *ho-1* confirma también que a mayor concentración extracelular de hem mayor es la entrada de hem a la célula. Sin embargo, parece ser que este aumento en la captación no está vinculado a un incremento importante en la expresión de *hcp1*, ya que ésta no presenta una variación significativa para ninguna concentración de hem.

Si bien hasta la fecha no existen estudios publicados acerca de la respuesta a Fe hemínico, se sabe que *hcp1* no se ve afectado transcripcionalmente por el estatus de Fe corporal en ratones pero sí presenta un cambio de localización subcelular, encontrándose en la membrana apical de enterocitos duodenales en deficiencia de Fe y desplazándose al citoplasma cuando los animales están repletos de Fe (Shayeghi y cols., 2005). Por lo tanto, se puede esperar que en estas células la mayor parte de HCP1 se encuentre en la membrana apical en condiciones basales, ya que fueron crecidas en deficiencia de Fe y, por lo tanto, al haber más hem disponible éste sea absorbido de manera proporcional.

El aumento de expresión de *flvcr* en respuesta a diferentes concentraciones extracelulares de hem podría significar que un aumento de hem intracelular induce el transporte a través de la membrana basolateral. Sin embargo, a una concentración de 50 μ M hem, la expresión de *flvcr* cae nuevamente a niveles basales. Esta disminución podría deberse a la activación un mecanismo de protección, impidiendo la salida de hem hacia el exterior basolateral, lo que *in vivo* significaría bloquear el transporte de hem hacia la circulación, y así poder controlar la absorción de Fe. No se puede descartar que FLVCR esté presente también en la membrana apical y participe en la secreción de hem en ambas direcciones, la cual ha sido previamente reportada (Uc y cols., 2004), protegiendo así del daño oxidativo que puede causar un exceso de hem en la célula enterocítica.

A diferencia de lo que ocurre para un estímulo de 24 hrs, cuando el hem es suministrado por 5 días desaparece la inducción observada anteriormente para *ho-1* y *flvcr*, indicando que la célula se adapta a una mayor cantidad de hem externo, posiblemente disminuyendo su absorción debido a una regulación negativa de la actividad de HCP1 en la membrana apical, el cual podría desplazarse hasta el citoplasma frente al aumento de Fe intracelular, como se ha reportado en ratón (Shayeghi y cols., 2005).

Mientras que el Fe hemínico induce una respuesta dependiente de la concentración en la expresión de *ho-1* y *flvcr*, no se observa el mismo efecto con Fe inorgánico, indicando que la inducción está mediada por hem y no por el Fe liberado por su degradación. Hasta ahora sólo se conoce el mecanismo molecular que permite al hem actuar como inductor de *ho-1*, pero aún faltar dilucidar si es este mismo

mecanismo el que está involucrado en la inducción de *flvcr* o si ésta ocurre por un mecanismo diferente.

4.3 Expresión de *hcp1*, *flvcr* y *ho-1* en respuesta al tiempo de estímulo con Fe hemínico.

Nuestros resultados muestran que al incubar células Caco-2 con hem por diferentes periodos de tiempo, a una concentración de 20 μ M, la expresión de *ho-1* y *flvcr* presentan un comportamiento similar, con el mismo máximo de inducción a las 12 hrs de estímulo, mientras que la expresión de *hcp1* no parece variar significativamente a ninguno de los tiempos estudiados. La concordancia entre *ho-1* y *flvcr* podría dar cuenta de que frente a un aumento de hem intracelular se activan simultáneamente la degradación y salida de hem de la célula, por lo que ambas vías competirían al aumentar la cantidad de hem intracelular. Faltan evidencias que puedan confirmar si el hem exportado es el mismo hem captado en membrana apical o es hem sintetizado *de novo* por la célula. Probablemente, dado la inducción que sufre *ho-1*, gran parte del hem que ingresa a la célula sea degradado, pero no se puede descartar que una parte significativa permanezca intacta y sea transportada por FLVCR.

En la Figura 14 se muestra un modelo de la regulación de absorción de hem, propuesto en base a los resultados aquí obtenidos y al conocimiento actual sobre el tema.

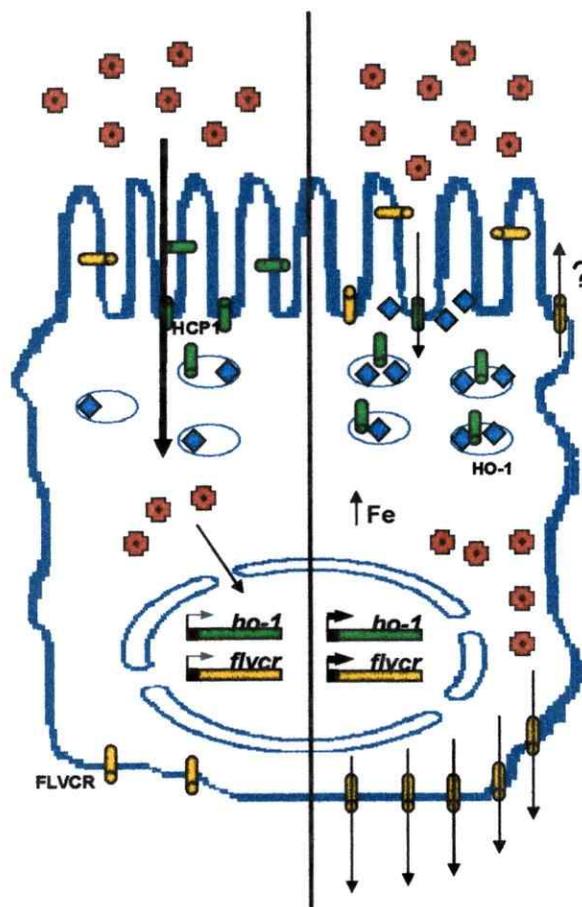


Figura 14. Modelo de regulación de la absorción de hem. En células intestinales deficientes en Fe (izquierda) HCP1 se encontraría predominantemente en la membrana apical y HO-1 y FLVCR presentarían niveles bajos. Al recibir una dosis de hem, éste sería captado por HCP1, aumentando los niveles de hem intracelular, lo cual desencadenaría un aumento en los niveles de HO-1 y FLVCR y del Fe interno (derecha). El aumento de FLVCR implicaría una mayor salida de hem por el extremo basolateral y tal vez también por el extremo apical. Si el estímulo se prolonga en el tiempo, HCP1 cambiaría su localización de membrana hacia compartimientos citoplasmáticos y por consiguiente disminuiría la entrada de hem, restableciéndose los niveles de HO-1 y FLVCR.

5. CONCLUSIONES

Los hallazgos obtenidos en la presente tesis indican que la exposición de células tipo epitelio intestinal Caco-2 a una fuente de Fe-hem produce:

- 1) Alteraciones en la expresión de los genes implicados en su degradación y exportación, *ho-1* y *flvcr* pero no en del transportador involucrado en su captación, *hcp1*.
- 2) Una regulación positiva de la expresión de *ho-1* y *flvcr* en presencia de hem, lo que en parte confirma nuestra hipótesis inicial. La expresión de ambos genes presenta un comportamiento similar a través del tiempo, indicando que posiblemente ambos procesos, de degradación y salida de hem, se activan y ocurren en forma paralela.

6. BIBLIOGRAFIA

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

Alam J., Stewart D., Touchard C., Boinapally S., Choi A.M. y Cook J.L. 2000. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.* **274**: 26071–26078.

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

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

Cable J.W., Cable E.E. y Bonkovsky H.L. 1993. Induction of heme oxygenase in intestinal epithelial cells: Studies in Caco-2 cell cultures. *Mol. Cell. Biochem.* **129**: 93–98.

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

Crichton R.R., Wilmet S., Leggsy R. y Ward R.J. 2002. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J. Inorg. Biochem.* **91**: 9–18.

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. y Zon L.I. 2000. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **403**: 776–781.

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

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

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

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

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

Huggenvik J.I., Craven C.M., Idzerda R.L., Bernstein S., Kaplan J. y McKnight G.S. 1989. A splicing defect in the mouse transferrin gene leads to congenital atransferrinemia. *Blood* **74**: 482–86.

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

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

Light W.R. y Olson J.S. 1990. Transmembrane movement of heme. *J. Biol. Chem.* **265**: 15623–15633.

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

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

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

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

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

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

McKie A.T., Barrow D., Latunde-Dada G.O., Rolfs A., Sager G., Mudaly M., Richardson C., Barlow D., Bomford A., Peters T.J., Raja K.B., Shirali S., Hediger M.A., Farzaneth F. y Simpson R.J. 2001. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **291**: 1755–1759.

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

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

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

Padmanaban G., Venkateswar V., Rangarajan P.N. 1989. Haem as a multifunctional regulator. *Trends Biochem. Sci.* **14**: 492-496

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

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

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

Roy C.N. y Enns C.A. 2000. Iron homeostasis: new tales from the crypt. *Blood* **96**: 4020–4017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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