

UCH-FC
Biotecnología
F634
c.1

Miguel
Miguel Arredondo Olguín



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**“CARACTERIZACIÓN DE LA CAPTACIÓN APICAL DE HIERRO
HEMÍNICO EN CÉLULAS TIPO EPITELIO INTESTINAL”**

Memoria de Título
entregada a la
Universidad de Chile
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular



Sebastián Esteban Flores Del Castillo

**Junio, 2007
Santiago – Chile**

Director de Memoria de Título: Dr. Miguel Arredondo Olguín

Co-Director de Memoria de Título: Dr. Fernando Pizarro Aguirre



“CARACTERIZACIÓN DE LA CAPTACIÓN APICAL DE HIERRO HEMÍNICO EN CELULAS TIPO EPITELIO INTESTINAL”

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

SEBASTIÁN ESTEBAN FLORES DEL CASTILLO.

MIGUEL ARREDONDO OLGUÍN

Director Seminario de Título

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a horizontal line at the end, positioned above a horizontal line.

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Christian González-Billault

Presidente Comisión

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized initial 'C' and 'B', positioned above a horizontal line.

Dr. Daniel Wolff Fernández

Corrector

A handwritten signature in black ink, appearing as a series of connected loops and a vertical line at the end, positioned above a horizontal line.



Santiago de Chile, junio de 2007



A mis padres y mi futuro hijo...



Nací en Santiago y es aquí donde he aprendido y se ha formado todo lo que soy, en un hogar donde siempre se respetó mi opinión, y se me permitió decidir cada paso en mi camino. Es así como al momento de terminar la educación media, tuve la libertad de escoger el camino mas difícil, el de la búsqueda del conocimiento. Ingresé junto con el nuevo milenio a la facultad de ciencias de la Universidad de Chile, donde gocé y sufrí los mejores años de mi vida, conocí a un mágico grupo de personas, y junto a ellos recorrí este arduo camino que junto con esta tesis doy por finalizado. Es el momento de emprender un nuevo rumbo, esta vez con las mejores herramientas que me pudieran haber entregado, el conocimiento y la capacidad de razonar.

“Tal vez nunca sepa todas las respuestas, pero cada día estaré mas cerca”

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, que siempre me incentivaron a buscar la respuesta a mis dudas, me han apoyado en cada escollo del camino con su amor y confianza, a pesar de que muchas veces no me comprendan, y me han hecho ver que siempre puedo dar un poco más de mí.

A Miguel por ser mas que un mentor, un amigo, con el cual espero contar por siempre.

A Angélica, Paula, Liliana, Solange, Fernando, Manuel y Joel por hacerme sentir del laboratorio un segundo hogar.

A mis compañeras de laboratorio y grandes amigas María José y Carolina, por el apoyo en los momentos difíciles y porque sin ustedes nada hubiese sido posible.

A la facultad de ciencias, por permitirme crecer como persona, así como a mi querido Instituto del cual siempre estaré agradecido.

A mis compañeros de carrera y grandes amigos Ignacio, Ronny, Ricardo, Rodrigo, Felipe y Alejandro, por compartir nuestros problemas y demostrarnos que con la ayuda mutua todo tiene solución, y que el camino de la ciencia se puede recorrer de formas distintas, pero con las mismas ganas de aprender y conocer lo que nos rodea.

A mis compañeros de Pianteam, por ser un club mas social que deportivo y mas que una pasión una angustia.

A todos mis compañeros de Biotecnología, por darme los mejores años de mi vida, ser el mejor grupo de personas que podría haber conocido, un grupo sólido a pesar de las diferencias y no dejar de sorprenderme hasta hoy por su entusiasmo en cada meta que nos proponemos en conjunto.

A Laura, por ser mi cable a tierra, por darme el amor que necesito y el mejor regalo que podría haberme dado.

A mis inseparables amigos Diego, Victor y Demián, porque siempre están ahí para escucharme, soportarme, reír y llorar cuando es necesario.



INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION	1
I. Aspectos Generales	1
II. Homeostasis de hierro	2
III. Captación de hierro inorgánico	4
IV. Captación de hierro orgánico	5
V. Naturaleza del problema	6
VI. Hipótesis de trabajo	7
VII. Objetivos	8
2. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1 <u>Materiales</u>	9
2.1.1 Reactivos	9
2.1.2 Equipos	10
2.1.3 Material de Cultivo	11
2.1.4 Células Caco-2	12
2.2 <u>Métodos</u>	12
2.2.1 Cultivo Celular	12
2.2.2 Preparación de suero fetal bovino bajo en hierro	13
2.2.3 Marcación isotópica de hemoglobina	13
2.2.4 Digestión de hemoglobina	14
2.2.5 Incubación de células Caco-2 con diferentes concentraciones de hierro hemínico e inorgánico	14
2.2.6 Extractos celulares y hierro intracelular	15
2.2.7 Medición de ferritina (Fn) intracelular	16
2.2.8 Experimentos de captación y transporte ttransepitelial de Fe hem y Fe inorgánico en células Caco-2	17
2.2.9 Anticuerpos e inmunodetecciones	18
2.2.10 Localización intracelular de HO1 mediante microscopía confocal	19
2.2.11 Estudios de endocitosis: acidificación de citosol y depleción de potasio	19
2.2.12 Rol del calcio en la captación de hierro hemínico	20
2.2.13 Efecto de la depleción de colesterol a nivel de membrana	20



2.2.14	Efecto de la disrupción de microtúbulos	21
2.2.15	Efecto de la disrupción de filamentos de actina	21
2.2.16	Inhibición del destinamiento de proteínas entre retículo endoplásmico y Golgi	21
2.2.17	Inhibición de la endocitosis por óxido de fenilarsina	22
2.2.18	Análisis estadístico	22
3.	RESULTADOS	23
3.1	Contenido intracelular de hierro en células Caco-2 incubadas con diferentes concentraciones de hemoglobina (Hb), hemoglobina digerida (Fe hem) y hierro inorgánico.	23
3.2	Efecto de la temperatura en la captación de Fe hem	24
3.3	Expresión de hemoxigenasa 1 (HO1) en células Caco-2 incubadas con distintas concentraciones de Fe hem	25
3.4	Estudios de cinética de captación de Fe hem en células Caco-2 sometidas a tratamientos de depleción de potasio y acidificación de citosol	27
3.5	Efecto del calcio en la captación de hierro hemínico	28
3.6	Uso de drogas inhibitorias de procesos endocíticos como vías de estudio del ingreso de Fe hem al interior de células Caco-2	30
3.6.1	Efecto de la depleción de colesterol a nivel de Membrana	31
3.6.2	Efecto de la disrupción de microtúbulos	33
3.6.3	Efecto de la disrupción de filamentos de actina	36
3.6.4	Inhibición del destinamiento de proteínas entre retículo endoplásmico y Golgi	37
3.6.5	Inhibición de la endocitosis por óxido de fenilarsina	38
3.7	Análisis de la ubicación de HO1 a nivel celular, mediante microscopía confocal	40
4.	DISCUSIÓN	43
5.	CONCLUSIONES	50
6.	BIBLIOGRAFIA	53



INDICE DE TABLAS

Tabla I:	Efecto de la temperatura en la captación de Fe hem y Fe-NTA	25
----------	---	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Composición corporal de hierro	3
Figura 2:	Degradación de Fe hem por HO1	6
Figura 3:	Contenido intracelular de hierro en células Caco-2	23
Figura 4:	Contenido intracelular de ferritina en células Caco-2	24
Figura 5:	Expresión de HO1 frente a distintas concentraciones de Fe hem	26
Figura 6:	Análisis Densitométrico del Western Blot para HO1	26
Figura 7:	Efecto de la Acidificación de Citosol y Depleción de Potasio en la captación de Fe hem por parte de células Caco-2	28
Figura 8:	Captación de Fe hem en células Caco-2 expuestas a calcio, EGTA y EDTA	30
Figura 9:	Acción de las drogas utilizadas	31
Figura 10:	Estructura molecular de las drogas utilizadas	31
Figura 11:	Efecto de la depleción de colesterol a nivel de membrana	33
Figura 12:	Captación de Fe hem y manitol en células Caco-2 tratadas con nocodazol como agente disruptor de microtúbulos	34
Figura 13:	Captación de Fe hem en células Caco-2 tratadas con colchicina como agente disruptor de microtúbulos	35
Figura 14:	Efecto de la interrupción de filamentos de actina	36
Figura 15:	Efecto de la interrupción del destinamiento entre retículo endoplasmático y Golgi	38
Figura 16:	Efecto del Óxido de Fenilarsina en la captación de Fe hem de células Caco-2	39
Figura 17A:	Imágenes de microscopía confocal	41
Figura 17B:	Imágenes de microscopía confocal y tratamientos de depleción de potasio y interrupción de microtúbulos	42
Figura 18:	Modelo de la captación de hierro en células intestinales	52



Abreviaturas

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
BFA	Brefeldina A
BSA	Albúmina sérica de bovino
Cit D	Citocalasina D
DMEM	Medio mínimo esencial Dulbecco.
DMT1	Transportador de metales divalentes.
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilen diamino tetraacético.
ELISA	Ensayo inmuno enzimático absorbente
Fe	Hierro
Fe hem	Hierro hemínico.
Fn	Ferritina
Glut1	Transportador de Glucosa tipo 1
Hb	Hemoglobina
HCPI	Proteína transportadora de Fe hem
HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico.
HO	Hem oxigenasa.
Ig G	Inmunoglobulina G
MBCD	Metil - β - Ciclodextrina
MTOC	Centro organizador de microtúbulos.
NP-40	Nonidet P-40.
NTA	Nitriloacetato



O ₂	Oxígeno molecular
PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida.
PAO	Oxido de fenilarsina
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-MC	Tampón fosfato salino magnesio-calcio
PBST	Tampón fosfato salino - Tween 20
RET	Resistencia eléctrica transepitelial.
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal de bovino
siARN	Acidos ribonucleicos de interferencia pequeños
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina.



RESUMEN

Puede considerarse que el hierro en el organismo se encuentra en dos compartimentos, uno funcional formado por proteínas, entre las que se incluyen la hemoglobina, mioglobina, transferrina y enzimas que requieren hierro como cofactor, como grupo prostético o como grupo hem; y un compartimiento de depósito, constituido por la ferritina y la hemosiderina, que constituyen las reservas corporales de este metal.

Es sabido que la absorción de hierro hemínico y de hierro no hemínico son independientes.

La captación de hierro hemínico por parte de enterocitos no está bien esclarecida, y se ha sugerido que podría ocurrir mediante micro-endocitosis, endocitosis mediada por receptor o, incluso por flujo a través de la membrana en un proceso independiente de receptor (ya que el grupo hemínico se intercalaría en el ambiente hidrofóbico de la bicapa lipídica).

Recientemente, se identificó un transportador de hierro hemínico intestinal, denominado HCP1 resolviendo parte de esta incógnita. Sin embargo, el dilema continúa debido a que, usando la técnica de siARN (ARN de interferencia pequeños) se bloqueó la actividad del transportador, pero no se detuvo por completo la captación de hierro hemínico, lo que evidencia otra vía de ingreso a la célula intestinal, aún no descubierta.

El objetivo de este trabajo es identificar y caracterizar estas otras vías de captación de hierro hemínico. Para ello utilizamos como sistema modelo de epitelio intestinal células Caco-2, en las cuales caracterizamos el proceso de captación de hierro hemínico. Nuestros resultados indican que este es un proceso dependiente de la temperatura, saturable en el tiempo, que modifica la maquinaria celular al aumentar la expresión de proteínas vinculadas a su propio metabolismo como HO1, que ingresa a la

célula mas eficientemente que la molécula completa de hemoglobina, pero a niveles mucho menores al hierro inorgánico libre, que la entrada de la molécula de Fe hem se ve disminuída en presencia de calcio, y favorecida cuando se encuentran quelantes del mismo en el medio (EDTA o EGTA), que al disminuir el colesterol en la membrana aumenta su captación, que la disrupción de microtúbulos no tiene un efecto significativo en dicho proceso, que la disrupción de filamentos de actina aumenta la captación de Fe hem, que al bloquear el tráfico de proteínas entre el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático existe un aumento ligero de la captación de Fe hem, y que al bloquear la endocitosis de proteínas con óxido de fenilarsina se aprecia un aumento significativo en la captación de hierro hemínico.

Estos resultados y los obtenidos con tratamientos con inhibidores de la endocitosis en células Caco-2, nos permite concluir que el ingreso mediado por el transportador HCP1 no es la única forma de entrada de Fe hem a la célula, HCP1 juega un rol preponderante en la captación, además del Fe hem que pudiera ingresar a la célula a través de procesos endocíticos específicos o inespecíficos. El efecto inhibidor en la captación de hierro hemínico por calcio, podría explicarse por un efecto de este ión sobre el transportador HCP1 o sobre la(s) otra(s) vía(s) de ingreso de Fe hem. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el calcio de alguna forma afecta el funcionamiento de HCP1.

Igualmente, nuestros resultados permiten confirmar nuestra hipótesis inicial de que la entrada de hierro hemínico a la célula de epitelio intestinal es regulada por una o más proteínas presentes en la membrana (como HCP1), que responden a estímulos como cambios de temperatura, a la concentración de ligando o a otros elementos presentes en el medio (como calcio) y que se ven afectadas al interrumpir o alterar su tráfico y destinamiento, o la composición de la propia membrana. Un aporte al modelo

de captación de Fe hem por parte de la célula de epitelio intestinal, incluiría entonces dos vías de entrada para esta molécula a la célula, siendo la principal a través de HCP1, y una con menor capacidad de transporte mediante pinocitosis o endocitosis mediada por receptor.

INTRODUCCIÓN

I. Aspectos Generales

Las células mantienen su medio interno estable obteniendo nutrientes del exterior y eliminando sustancias procedentes del metabolismo a través de la membrana celular. La membrana plasmática debido a su estructura lipoproteica permite el transporte selectivo de moléculas y iones de un compartimiento a otro. Los mecanismos de transporte de solutos a través de la membrana, dependen de las características moleculares del soluto a transportar.

Las moléculas hidrofóbicas pequeñas se transportan a través de la bicapa fosfolipídica. En cambio los iones, moléculas orgánicas polares y el agua son transportados a través de proteínas integrales de membrana específicas. Las moléculas orgánicas polares de bajo peso molecular y los iones pueden ingresar mediante transporte pasivo (difusión facilitada) o transporte activo (activo primario, donde la energía proviene de una reacción bioquímica como la hidrólisis de ATP; o activo secundario, que utiliza la energía proveniente del gradiente de potencial electroquímico generado por la diferencia en las concentraciones de un soluto a ambos lados de la membrana). Los iones también se pueden transportar pasivamente a través de canales de iones. Las moléculas de alto peso molecular en cambio, ingresan a la célula por endocitosis.

Todas las células eucariontes exhiben una o más formas de endocitosis. La endocitosis juega un papel en la mantención de la homeostasis celular, recuperando proteínas y componentes lipídicos insertados en la membrana, a través de su actividad secretora (Alberts y col. 1996; Mellman, 1996).

Se denomina fagocitosis a la internalización de grandes partículas (diámetro superior a 0,5 micrones), habilidad que está asociada principalmente a protozoos fagocíticos (*Dyctiostelium*, *Acanthamoeba*) o leucocitos que participan en el sistema inmune de los mamíferos (Mellman, 1996). Por otra parte, el término pinocitosis se refiere a la formación constitutiva de vesículas más pequeñas (diámetro menor a 0,2 micrones) las que transportan fluido extracelular y macromoléculas unidas en forma específica o inespecífica a la membrana. Estas vesículas se forman usualmente por estructuras de clatrina, pero en forma alternativa se pueden formar vesículas de caveolina y/o un mecanismo basado en actina (Mellman, 1996). Por lo general dos o mas de estos mecanismos coexisten en un mismo tipo celular (Mellman, 1996).

II. Homeostasis de hierro

El hierro (Fe) es un elemento esencial para todas las formas de vida al participar en procesos de oxido-reducción, transporte y manejo de O₂ (hemoglobina y mioglobina), transporte de electrones (citocromos), metabolismo de neurotransmisores y síntesis de ADN (Crichton, 1991). Este metal tiene además la capacidad de generar radicales libres a través de la reacción de Fenton, que dañan componentes biológicos esenciales como

lípidos, proteínas y ADN (McCord, 1998), por lo tanto su metabolismo debe ser controlado mediante un potente sistema regulador (Forrelat y col, 2000).

Puede considerarse que el hierro dentro del organismo se encuentra formando dos compartimentos: uno funcional formado por numerosas proteínas, entre las que se incluyen la hemoglobina, mioglobina, transferrina y las enzimas que requieren hierro como cofactor o como grupo prostético, ya sea en forma iónica o como grupo hem, y un compartimiento de depósito, constituido por la ferritina y la hemosiderina, que constituyen las reservas corporales de este metal (Forrelat y col, 2000).

El contenido total de hierro en un individuo normal es de aproximadamente 3,5 a 4 gramos en la mujer y de 4 a 5 gramos en el hombre. En individuos con un estado nutricional óptimo, alrededor del 65% de hierro se encuentra en forma de hemoglobina, 5% en enzimas, 10% en mioglobina, 20% como hierro de depósito y solo entre 0,1 y 0,2% como hierro de transporte en forma de transferrina (Figura 1; Forrelat y col, 2000).

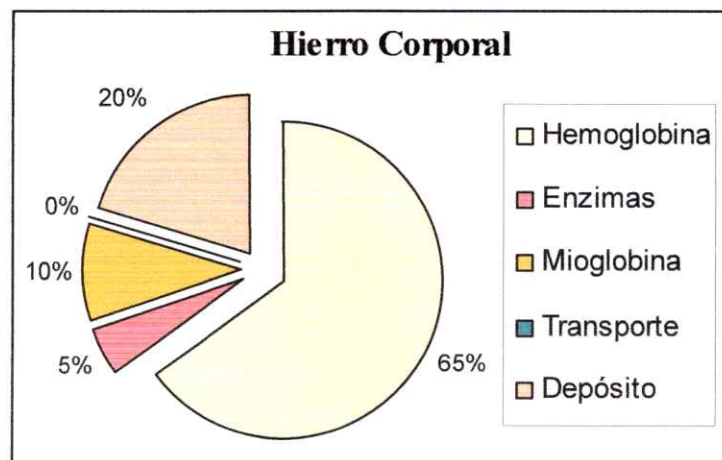


Figura 1. Composición corporal de hierro. Conformación porcentual de hierro a nivel corporal en individuos con alimentación dentro de los niveles adecuados de nutrición.

Recientemente se han identificado nuevas proteínas que participan en la absorción intestinal de Fe no hem, y se han publicado trabajos enfocados al transporte de Fe vinculado a la hemocromatosis hereditaria (Fleming & Sly, 2002; Hediger y col, 2002; Nuñez y col, 2000). Interesantemente, el mecanismo de la absorción de Fe hem continúa siendo un misterio, a pesar de su importancia en términos nutricionales y del hecho de que su absorción es mas eficiente que la de Fe no hem (Miret y col, 2003).

III. Captación de Fe Inorgánico.

El Fe no hemínico (o inorgánico) existe en la dieta en forma ferrosa reducida (Fe^{+2}), o forma férrica oxidada (Fe^{+3}). El Fe^{+2} entra a la célula través del transportador apical DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) al espacio intracelular (Conrad & Umbreit, 2002). Bajo condiciones fisiológicas normales (pH neutro y presencia de oxígeno), el Fe^{+2} es oxidado rápidamente a Fe^{+3} , el cual precipita como hidróxido de Fe. En el lumen del intestino el hierro probablemente se encuentra como Fe^{+3} y, por lo tanto, con baja biodisponibilidad (Miret y col, 2003). El Fe inorgánico es absorbido en bajas cantidades en la primera parte del intestino delgado (duodeno y parte del yeyuno), donde el pH es aún ácido, lo cual favorece su solubilización y reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} , la que se ve estimulada por la presencia de ácido ascórbico o por la acción de la ferrireductasa apical Dcyt b del enterocito. (Conrad & Umbreit, 2002).

IV. Captación de Fe Orgánico

El hierro hemínico (Protoporfirina ferrosa IX) es un cofactor importante de proteínas celulares como los citocromos, hemoglobina, y mioglobina, que participan en el transporte de oxígeno, reacciones de transferencia electrónica y otras reacciones de óxido reducción (Lippard & Berg, 1994).

Es sabido que la absorción del Fe hemínico y del Fe no hemínico son independientes (Halberg & Bjomm-Rasmush, 1972). El Fe hemínico se encuentra en la dieta de poblaciones consumidoras de carne, y constituye una importante fuente de hierro. Contrariamente al Fe inorgánico, el Fe hemínico es altamente biodisponible. Se ha demostrado que el anillo metaloporfirínico se separa de la globina en el lumen del intestino, y que la metaloporfirina intacta es transportada a través de la membrana apical sin ser degradada a Fe libre y porfirina.

Una vez en la célula, el hierro hemínico es liberado del núcleo porfirínico como Fe^{+3} , monóxido de carbono y biliverdina en una reacción catalizada por la enzima hem oxigenasa (HO) en compartimentos microsomales (Figura 2). El Fe^{+3} es reducido y así pasa a formar parte del pool de hierro interno de la célula, donde comparte su salida del enterocito con el hierro que ingresa en estado inorgánico. La captación de hierro hemínico disminuye a lo largo del intestino (mayor en duodeno, menor en yeyuno y escasa en ileon), por esta razón la capacidad de aprovechar esta fuente de hierro entre distintas especies varía, siendo mayor en caninos que en roedores (Miret y col, 2003).

Parte de la incógnita respecto de la absorción del Fe hem, ha sido resuelta, al identificarse un transportador de Fe hemínico intestinal, denominado HCP1 (Proteína Transportadora de Hierro Hemínico) que presenta alta homología con proteínas que otorgan resistencia a tetraciclina. Se ha encontrado que al usar siARN (ARN de interferencia pequeños) se puede bloquear la actividad del transportador, sin detenerse por completo la captación de Fe hemínico, lo que indica la existencia de otra vía de ingreso a la célula intestinal, aún no descubierta (Shayeghi y col, 2005)

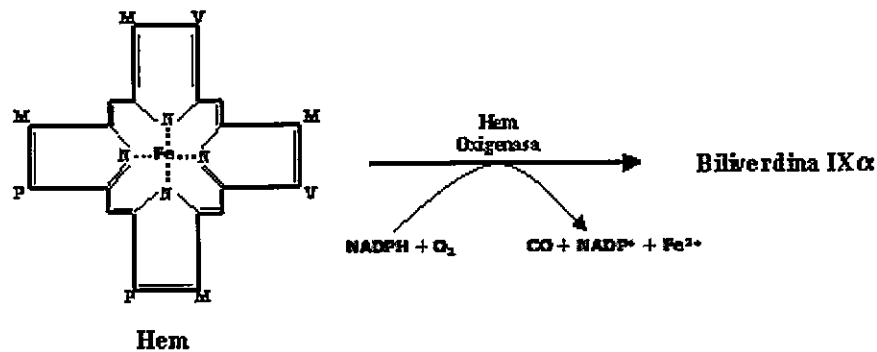


Figura 2. Degradación de Fe hem por HO1. Degradación del hierro hemínico a biliverdina por la acción de la enzima microsomal Hem oxigenasa. La estequiometría de esta reacción es tres moles de O_2 y tres moles de NADPH por mol de hierro hemínico.

V. Naturaleza del problema

La absorción de hierro hemínico por parte del enterocito no está bien esclarecida aún, y se ha sugerido que podría ocurrir mediante (a) un proceso de micro-endocitosis (Wyllie & Kaufman, 1982; Parmley y col, 1981). Al tomar imágenes de microscopía óptica se observa la molécula de Fe hem en microvesículas y posteriormente degradándose en lisosomas, (b) endocitosis mediada por receptor (Worthington y col,

2001; Grasbeck y col, 1982) al encontrarse un receptor putativo en epitelio intestinal de cerdo, (c) difusión facilitada a través de HCP1, proteína caracterizada en ratas (Shayeghi y col, 2005), o (d) por flujo a través de la membrana en un proceso independiente de receptor, en el que el grupo hemínico se intercalaría en el ambiente hidrofóbico de la bicapa lipídica (Liem y col, 1994; Light & Olson, 1990).

De acuerdo con estos antecedentes, la captación de hierro hemínico en células de epitelio intestinal estaría simultáneamente involucrando mas de un sistema de captación. Para identificar estos sistemas, se hace necesario caracterizar este proceso, determinando como se ve afectada su captación por factores como la concentración de hierro hemínico en el medio, como responde a cambios en la concentración de solutos en el lumen intestinal , y determinando si alteraciones en las distintas formas de captación de las células intestinales afectan su internalización.

VI. Hipótesis de trabajo

Para explicar el proceso de captación de hierro hemínico desde el lumen intestinal a la célula de epitelio intestinal, hemos propuesto la siguiente hipótesis de trabajo: **“La entrada del hierro hemínico al enterocito está regulada por proteínas presentes en la membrana apical de la célula intestinal, que responden a estímulos como cambios de temperatura, a la concentración del ligando o a otros elementos como calcio en el medio, que se ven afectadas al interrumpir o alterar su tráfico y/o destino o al modificar la composición de la propia membrana plasmática”.**

VII. Objetivos

Objetivo General

Para probar nuestra hipótesis, se planteó como objetivo general **“Estudiar el mecanismo mediante el cual la molécula de hierro hemínico ingresa a través de la membrana apical de células de la línea tipo epitelio intestinal Caco-2”**.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar cinéticamente la captación apical y transporte apical-basolateral de Fe hemínico.
2. Estudiar la dependencia de la temperatura de la captación de Fe hemínico.
3. Estudiar si el proceso de endocitosis mediado por clatrina participa en la captación de Fe hemínico.
4. Estudiar el efecto del calcio en la captación de Fe hemínico.
5. Analizar el efecto en la captación de hierro hemínico de drogas inhibitoras de distintos procesos endocíticos.
6. Observar la localización intracelular de la enzima hem oxigenasa 1 (HO1), enzima responsable de la liberación de hierro libre a partir de la molécula de hierro hemínico.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Reactivos

Los reactivos utilizados en la presente tesis tuvieron el siguiente origen:

- Sigma:** . Suero fetal bovino, PBS, penicilina/estreptomina, nonidet P40, betamercaptoetanol, tritón X100, azul de bromofenol, pepsina, óxido de fenilarsina, brefeldina A, metil- β -ciclodextrina, nocodazol, citocalasina D, colchicina, cóctel inhibidor de proteasas, IgG anti-actina desarrollado en ratón.
- Merck:** NaCl, KCl, NaOH, HCl, tween 20, bisacrilamida, D-manitol, reactivo de Folin-Ciocalteus, NaHCO₃, Na₂CO₃, CaCl₂, FeCl₃.
- Gibco:** Fungizona, DMEM, Iscove, Tris, SDS, acrilamida, EDTA, bicarbonato de sodio, glicerol, azul de Coomassie, TEMED, tripsina, antibiótico/antimicótico.
- Winkler:** Etanol, metanol, glicina, albúmina de suero bovino.

National Diagnostics:	Ultraflúor.
Invitrogen:	Marcador de peso molecular preteñido de proteínas.
Pierce:	IgG unido a peroxidasa de rábano anti-mouse y anti-rabbit.
Santa Cruz Biotechnology:	IgG anti-HO1 desarrollado en conejo.
Chemicon International:	IgG anti S-Glut1 desarrollado en conejo.
Molecular Probes:	Kit marcador tricolor de IgG Zenon™.
Drag Pharma:	Ketostop, Pacifor.
Applichem:	Kit quimioluminiscente para peroxidasa de rábano.

Equipos

- 1) Contador de centelleo líquido, Canberra-Packard TR-1600.
- 2) Incubadora CO₂, Water Jacketed, Shel Lab.
- 3) Campana de flujo laminar, FASTER.
- 4) Mini Gel BIORAD, Mini Proteans.
- 5) BIORAD Transblot.
- 6) Microscopio confocal, Carl Zeiss LSM510.

- 7) Espectrómetro de absorción atómica, Perkin Elmer SIMAA 6100.
- 8) Lector de placas, Metertech 960.

Material de Cultivo

- 1) Botellas plásticas de 40 ml, área de crecimiento 25 cm², Orange Scientific (2020100).
- 2) Botellas plásticas de 270 ml, área de crecimiento 75 cm², Orange Scientific (2020200).
- 3) Placas de cultivo de 6 pocillos, 35 mm de diámetro, Orange Scientific (2020500).
- 4) Placas de cultivo de 12 pocillos, 22 mm de diámetro, Orange Scientific (2020400).
- 5) Placas de cultivo de 24 pocillos, 16 mm de diámetro, Orange Scientific (2020300).
- 6) Tubos de centrifuga plásticos Falcon, 15 y 50 ml.
- 7) Pipetas plásticas desechables Costar, 10 ml (4101).
- 8) Unidades de filtración desechables, tamaño de poro 0,2 μm, Costar, 500 ml (8344) y 1000 ml (8354).
- 9) Placas de ELISA, Nunc. Inc.
- 10) Insertos bicamerales de policarbonato, Transwell 6.5mm (3413).

Células Caco-2

La línea celular Caco-2 de la American Type Culture Collection (# HTB37, Rockville, MD), es derivada originalmente de un cáncer de colon (Fogh y col, 1977), y se utilizan como modelo de epitelio intestinal (Pitt y col, 1987; Arturson, 1991; Alvarez-Hernández y col, 1991). Estas células expresan el transportador Glut-5, un marcador de microvellosidad de intestino delgado que no se encuentra en colon (Mahraoui y col, 1992). Crecen en monocapas celulares altamente polarizadas y pueden ser utilizadas para transporte vectorial (Audus y col, 1990), presentan inhibición de la proliferación por contacto, forman uniones estrechas con una resistencia transepitelial de 280 a 320 ohm x cm² y abundantes microvellosidades. Estas células pueden cultivarse tanto en plástico como en insertos bicamerales.

MÉTODOS

1. Cultivo Celular: Células Caco-2 (HTB37), fueron mantenidas en medio mínimo esencial bajo en minerales (Iscove, Gibco), más suero fetal de bovino bajo en hierro (SFB) al 10%, 10 kU/L de penicilina/estreptomicina y fungizona 25 mg/L. 1×10^5 células/ml fueron crecidas en botellas de 40 ml (área de crecimiento 25 cm²) por siete días a 37° C, 5% CO₂. Durante este período, las células alcanzaron confluencia,

obteniéndose aproximadamente $1,5$ a $3,0 \times 10^6$ células/ml. Luego las células fueron tripsinizadas y resembradas en iguales condiciones.

2. Preparación de Suero Fetal de Bovino bajo en Fe: El SFB bajo en Fe fue preparado titulando el SFB con 300 g/L de Chelex 100 a pH 4,5. Luego se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante, para finalmente subir el pH a 7,2 con NaOH, en estas condiciones se incubó por una noche a 4° C sin agitación en presencia del Chelex (Alvarez-Hernández y col, 1994). El contenido de Fe del medio depletado fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica y la concentración de Fe en el medio fue siempre menor a $0,5 \mu\text{M}$.

3. Marcación Isotópica de Hemoglobina: El isótopo ^{55}Fe de alta actividad específica fue usado como marcador. La Hb marcada fue preparada usando eritrocitos de 2 conejos New Zealand, de 3 Kg de peso, los cuales recibieron una inyección intravenosa de 74 MBq de ^{55}Fe , como citrato férrico diluido en 2 ml de solución salina. Quince días después, los conejos fueron sangrados a través de una punción cardíaca. Los eritrocitos radioactivos fueron centrifugados ($1000 \times g$ por 15 minutos a 22° C), lavados con solución salina, hemolisados por congelamiento, y finalmente deshidratados por liofilización. Se obtuvieron glóbulos rojos secos, congelados con una actividad específica de 2460 kBq por miligramo de Hb.

4. Digestión de Hemoglobina: Para producir moléculas de Fe hem parcialmente libre, se realizó una digestión parcial de la hemoglobina (Miller y col, 1981). Una solución de hemoglobina (conteniendo 2 mM Fe) fue digerida con pepsina al 0,1%, y ajustado su pH a 2,0 con HCl, luego se incubó por 1 hora, a 37° C, con agitación continua. En este punto la solución fue diluida 5 veces adicionando tampón HEPES (Acido N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2-etano sulfónico), pH 7,2; para subir el pH a 6,8. Finalmente se centrifugó a 2500 rpm por 3 minutos y se recolectó el sobrenadante. Se estimó un porcentaje de digestión de $52 \pm 3\%$ midiendo el contenido de hemoglobina del sobrenadante. Este sobrenadante se usó como fuente de exposición de Fe hemínico a las células. El hierro elemental fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer, SIMAA 6100). De ahora en adelante al Fe hemínico digerido se le nombrará como Fe hem.

5. Incubación de células Caco-2 con diferentes concentraciones de hierro hemínico e inorgánico: Células Caco-2 fueron crecidas como se explicó anteriormente, durante una semana en botellas de 40 mL, cambiando el medio cada 2 o 3 días. La incubación se hizo usando una solución de ^{55}Fe hem o ^{55}Fe -nitriloacetato (^{55}Fe -NTA, 1:2) en medio Iscove, SFB bajo en hierro 10%; en las siguientes concentraciones: 0, 1, 5, 10, 20 y 50 μM de ^{55}Fe , ^{55}Fe -hemoglobina o ^{55}Fe hem. Al cabo de 7 días, las células fueron tripsinizadas y re-sembradas (5-10 % de las células iniciales, o sea 1×10^5), como se explicó anteriormente, por otros 7 días, con las mismas condiciones.

6. Extractos celulares y Fe intracelular: La concentración intracelular de hierro se determinó en células expuestas a tres fuentes de hierro distintas. Células Caco-2 fueron cultivadas como se explicó arriba por una semana en medio Iscove con diferentes concentraciones de ^{55}Fe , ^{55}Fe -hemoglobina y ^{55}Fe hem. Después de la incubación, se eliminó el medio de cultivo, se lavó 2 veces con PBS, y luego se incubó las células con 5 mL de tampón Tris salino-EDTA (Tris-HCl 40 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5 y EDTA 1 mM), por 10 minutos a 37° C. La suspensión celular fue transferida a un tubo de 15 mL y centrifugada a 1.000 rpm por 10 minutos, descartando el sobrenadante. El precipitado fue tratado con tampón de lisis (HEPES 10 mM, pH7,5; MgCl_2 3 mM; KCl 40 mM; Fenilmetilsulfonil fluoruro 1 mM; Leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Aprotinina 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Pepstatina A 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Glicerol 5%; Ditiotreitól 1 mM; Triton X-100 0,5%, Coctel inhibidor de proteasas 1x) en una razón de 10 μL de tampón por cada 1×10^6 células . La mezcla fue agitada en vórtex por 20 segundos, e incubada por 15 minutos en hielo, y centrifugada por 10 minutos a 4° C y 15000 rpm. El sobrenadante fue llevado a un volumen final de 25 μL por cada millón de células con tampón de lisis sin NP-40, alicuotado y guardado a -70° C. La determinación de proteínas de este extracto celular se realizó de acuerdo al método de Lowry (Lowry y col, 1951). La radioactividad de ^{55}Fe en los extractos celulares fue medida en un contador beta de doble canal y el Fe total por espectrometría de absorción atómica en extractos celulares.

7. Medición de Ferritina (Fn) Intracelular: La concentración de ferritina intracelular en los extractos celulares expuestas a concentraciones de 0 a 100 μM de Fe como Fe-NTA, Fe-hemoglobina y Fe hem se determinó a partir de un ensayo ELISA tipo sandwich (Arredondo y col, 1997). Placas de ELISA de 96 pocillos fondo plano, fueron recubiertas con 150 μL de anticuerpo antiferritina humana 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón carbonato 50 mM (Na_2CO_3 15 mM y NaHCO_3 35 mM, pH 9,6) e incubadas por una noche a 4° C. Las placas fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente con leche descremada 10%, en tampón fosfato salino (PBS) 150 mM (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM y KH_2PO_4 1,5 mM; pH 7,4), Tween 20 0,05% (PBST) y luego lavadas tres veces con tampón PBST. Este procedimiento bloqueó sitios no específicos de unión de proteínas. Luego, a 100 μL de PBST, BSA 1,0% por pocillo, se agregó en duplicado 10 μL de ferritina humana estándar (rango 4,5 a 225 pM) o 10 μL del extracto celular. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y luego se lavó tres veces con PBST. A cada pocillo se agregó 100 μL del anticuerpo antiferritina humana conjugado con peroxidasa de rábano diluído 1/20.000 en tampón PBST-BSA 1,0%, se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se lavó tres veces con PBST. Finalmente, a cada pocillo se le agregó 100 μL de sustrato para la peroxidasa (10 mg de dihidrocloruro de o-fenilendiamina, 10 μL de H_2O_2 en tampón fosfato cítrico (Na_2HPO_4 48 mM, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ 102 mM, pH 5,0)). Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo agregando 50 μL de H_2SO_4 25%. La densidad óptica fue leída a 492 nm en un lector de placas, Metertech 960.

8. Experimentos de captación y transporte transepitelial de Fe hem y Fe inorgánico en células Caco-2: Células Caco-2 fueron sembradas en frascos de 25 cm² de superficie y cultivadas como ya fue descrito, conteniendo diferentes concentraciones de Fe hem o Fe-NTA (1-50 µM). Después de 7 días, células Caco-2 fueron sembradas en insertos de policarbonato de 0,33 cm² (tamaño de poro de 3 µm) por aproximadamente 12 días y fueron incubadas como ya se explicó. El medio fue cambiado cada 3 días. La formación de la monocapa se determinó midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (RET) (Hidalgo y col, 1989; Peterson & Mooseker, 1993) con un multímetro volt-ohm, que posee un electrodo diseñado para alcanzar los lados apical y basolateral de los insertos. Los insertos fueron utilizados cuando alcanzaron valores estables de resistencia entre 240 y 260 Ω · cm², existiendo aproximadamente 220.000 células por inserto (Núñez y col, 1996). El día del experimento, las células fueron incubadas en su lado apical con ⁵⁵Fe hem o ⁵⁵Fe-NTA 10 µM, en tampón de transporte (MOPS-Na 50 mM; NaCl 94 mM; KCl 74 mM; MgCl₂ 0,74 mM; CaCl₂ 1,5 mM; Glucosa 5 mM; pH 6,0) a diferentes tiempos (0-60 minutos) a 37° C. El lado basolateral contenía tampón de transporte con desferroxamina 50 µM. Para detener la reacción, los insertos fueron lavados 3 veces con PBS-EDTA (PBS 1x con EDTA 1 mM) frío, y las células removidas usando tampón Tris salino-EDTA (Tris-HCl 40 mM; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; pH 7,5). La mezcla fue recolectada y centrifugada por 1 minuto a 10.000 rpm. El precipitado fue resuspendido, como se dijo anteriormente con tampón lisis. La presencia de ⁵⁵Fe hem y ⁵⁵Fe en los extractos celulares y el medio basolateral fue determinada mediante un

contador de centelleo líquido. Para estudiar el efecto de la temperatura, los experimentos de captación recién descritos se realizaron a 4 y 25° C.

9. Anticuerpos e inmunodetecciones: Se realizaron ensayos de Western blotting en extractos celulares para estudiar la expresión de hem oxigenasa 1 (HO1). Extractos de células Caco-2 (1 µg/µL) fueron cargados y separados por electroforesis en un gel denaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 14%, y, posteriormente transferidos a una membrana de nitrocelulosa. El anticuerpo primario contra HO1 (Santa Cruz Biotechnology; CA, USA) fue un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, contra una proteína recombinante correspondiente a los aminoácidos 184-288 que se ubican en el carboxilo terminal de la hem oxigenasa de origen humano. Como anticuerpo secundario se usó inmunoglobulina G anti-conejo desarrollada en cabra, conjugada a peroxidasa de rábano (Pierce; IL, USA). Para examinar las membranas se utilizó el sistema de detección de quimioluminiscencia para peroxidasa de rábano (Applichem, ALE). Como control de la cantidad total de proteína cargada en el gel, las membranas fueron lavadas con ácido cítrico 100 mM (pH 3,0) y se repitió el Western blot, esta vez con anticuerpo primario anti-actina desarrollado en ratón (Sigma; MI, USA), y anticuerpo secundario anti-ratón desarrollado en conejo y conjugado a peroxidasa de rábano (Pierce; IL-USA).

10. Localización intracelular de HO1 mediante microscopía confocal: Para determinar la localización intracelular de la proteína HO1 respecto a la polarización de las células Caco-2 se utilizó un microscopio confocal Carl Zeiss LSM510, se estudió la colocalización de HO1 y s-Glut1 (usando este último como marcador de membrana apical en células Caco-2), en células control y sometidas a tratamientos inhibidores de la endocitosis celular de distintos metabolitos. Las células fueron cultivadas por 7 días en cubreobjetos sumergidos en pocillos de 35 mm de diámetro. Luego, si correspondía, fueron sometidas a los tratamientos de depleción de potasio o incubación con Nocodazol (ver más adelante); y fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS-MC (PBS 1x; MgCl₂ 1 mM; CaCl₂ 0,1 mM), para posteriormente ser permeabilizadas con Tritón X-100 0,2% en PBS. Después, los anticuerpos anti HO1 (Santa Cruz Biotechnology; CA, USA) y s-Glut1 (Chemicon International; CA, USA), fueron incubados con Zenon Tricolor (Rabbit IgG labeling kit, Molecular Probes; OR-USA): Red para HO1 y Green para sGlut1 y las células incubadas por 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Las células fueron lavadas con PBS-MC y finalmente observadas por microscopía confocal.

11. Estudios de endocitosis: acidificación de citosol y depleción de potasio: Para estudiar si la captación de Fe hem se efectúa a través de endocitosis, o endocitosis mediada por receptor, células Caco-2 fueron crecidas como se explicó anteriormente. El día del experimento: (a) para la acidificación de citosol (Sandvig y col, 1987), las células fueron lavadas dos veces con medio Iscove sin suero, y luego incubadas por 10 minutos a 37° C con medio Iscove-Acido acético 10 mM, pH 5,0. Las células fueron lavadas dos

veces con tampón de unión de ligandos frío (medio Iscove sin suero, BSA 0,6%) y (b) para la depleción de potasio (Larkin y col, 1983), células Caco-2 fueron lavadas con tampón A (HEPES 20 mM pH 7,4; NaCl 140 mM; CaCl₂ 1 mM; MgCl₂ 1 mM) y luego incubadas durante 5 minutos a 37° C con medio hipotónico (tampón A: agua; 1:1) y lavadas con tampón de unión de ligandos frío. A continuación, para ambas técnicas se procedió a incubar las células con ⁵⁵Fe hem 50 μM en tampón de transporte, durante distintos tiempos (0-120 minutos) como en los demás experimentos de captación.

12. Rol del calcio en la captación de hierro hemínico: Con el fin de estudiar el rol del calcio en la captación de Fe hem, se realizaron ensayos de captación de ⁵⁵Fe hem en células Caco-2, como ya se ha descrito, con la diferencia que al tampón de transporte se le agregó CaCl₂, EDTA o EGTA 100 μM; estos últimos participando como quelantes general y específico de calcio, respectivamente.

13. Efecto de la depleción de colesterol a nivel de membrana: Células Caco-2 crecidas en placas de 12 o 24 pocillos durante 10-12 días, fueron tratadas con Metil-β-ciclodextrina 5 mM en medio Iscove por 30 minutos; con el fin de remover el colesterol presente en la membrana (Pike & Miller, 1998; Rodal y col, 1999; Subtil y col, 1999). A continuación, las células fueron lavadas con medio Iscove sin suero, y se realizó con ellas experimentos de captación de ⁵⁵Fe hem, como se explicó en forma anterior.

14. Efecto de la disrupción de microtúbulos: nocodazol y colchicina son drogas utilizadas como agentes disruptores de microtúbulos (Boye & Brossi, 1992; Decordier y col, 2002; Maples y col, 1997). Células Caco-2 crecidas en placas de 12 o 24 pocillos, al cabo de 10 a 12 días fueron tratadas con nocodazol 5 μM , o colchicina 10 μM en medio Iscove, durante 30 minutos, al cabo de los cuales fueron lavadas con medio Iscove sin suero y sometidas a experimentos de captación de ^{55}Fe hem o ^3H -manitol según correspondía.

15. Efecto de la disrupción de filamentos de actina: Células Caco-2 fueron tratadas esta vez con citocalasina-D 5 μM en medio Iscove, por 1 hora con el fin de evitar la constante polimerización de filamentos de actina (Rubtsova y col, 1998; Jackman y col, 1994; Maples y col, 1997; Mundy y col, 2002), posterior a dicho tratamiento, se realizaron experimentos de captación de ^{55}Fe hem con estas células.

16. Inhibición del destinamiento de proteínas entre retículo endoplásmico y aparato de Golgi: Para apreciar el efecto de la inhibición del tráfico de proteínas recién sintetizadas entre retículo endoplásmico y aparato de Golgi, se trataron células Caco-2 con Brefeldina-A (BFA) 5 μM en medio Iscove, durante 2 horas (Klausner y col, 1992), y luego se realizaron experimentos de captación de ^{55}Fe hem.

17. Inhibición de la endocitosis por óxido de fenilarsina (PAO): El óxido de fenilarsina es una droga utilizada para provocar un efecto inhibitorio en la endocitosis de distintos ligandos (Gibson y col, 1989). Para estudiar su efecto en la captación de hierro hemínico, células Caco-2 crecidas por 12 días en placas de 12 pocillos, fueron tratadas con PAO 10 μM en medio Iscove, durante 30 minutos. El efecto se determinó por ensayos de captación de ^{55}Fe hem realizados con posterioridad al tratamiento.

18. Análisis estadístico: Las variables fueron medidas en duplicados o triplicados y los experimentos fueron repetidos al menos dos veces. Anova de una vía fue usado para medir las diferencias en promedios. Anova de dos vías y test de Tukey fue usado para las comparaciones. Se usó el programa SigmaStat. Las diferencias fueron consideradas significativas si $P < 0,05$.

RESULTADOS

1. Contenido intracelular de hierro en células Caco-2 incubadas con diferentes concentraciones de Fe-hemoglobina (Hb), Fe hem y Fe inorgánico.

Células incubadas por un pasaje (7 días desde la inoculación hasta que alcanzan confluencia) con Fe-Hb o Fe hem mostraron concentraciones menores de hierro interno que aquellas expuestas a Fe inorgánico en las mismas concentraciones molares ($p < 0.01$). El contenido intracelular de Fe fue significativamente diferente ($p < 0.05$) entre el Fe-Hb y el Fe hem al comparar los valores obtenidos para la máxima concentración de hierro correspondiente a $50 \mu\text{M}$ (Figura 3), En esta concentración de hierro extracelular, los valores de hierro intracelular correspondieron a 10,8; 4,7 y 3,2 nmoles/mg de proteína, para el Fe inorgánico, Fe hem y Fe-Hb, respectivamente.

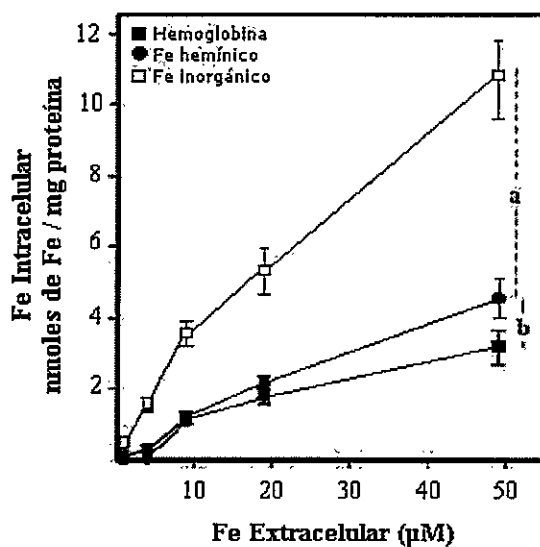


Figura 3. Contenido intracelular de hierro en células Caco-2. Las células fueron incubadas con Fe 0, 5, 10, 20 y $50 \mu\text{M}$ durante dos pasajes (un pasaje dura aproximadamente una semana), en las formas de Fe hemoglobina, Fe hem y de hierro inorgánico. El contenido de Fe intracelular fue determinado midiendo la radioactividad de los extractos celulares a las diferentes concentraciones, el número de experimentos (n) fue de 3 repeticiones, con duplicado para cada concentración de Fe extracelular.

La concentración intracelular de ferritina mostró una conducta similar a la del hierro intracelular. Como se observa en la Figura 4, la concentración de ferritina en células incubadas con Fe inorgánico 100 μM fue 9,1 ng de Fn/mg de proteína, que fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) a la de células incubadas con Fe-Hb 100 μM (7,3 ng de Fn/mg de proteína) o con Fe hem 100 μM (6,4 ng de Fn/mg de proteína).

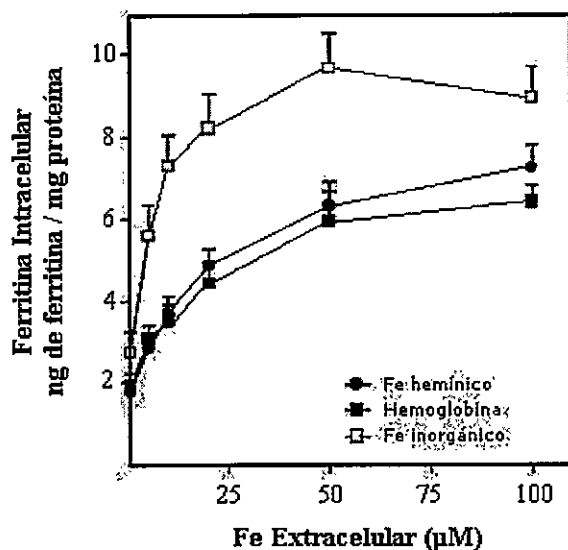


Figura 4. Contenido intracelular de ferritina en células Caco-2. La presencia de ferritina en células Caco-2 cultivadas con hierro en las tres formas se correlaciona en forma cuantitativa con el contenido de Fe al interior de la célula, $n = 3$, con duplicados para cada concentración de Fe extracelular. La determinación de ferritina se realizó después de dos pasajes de exposición a hierro (un pasaje corresponde a una semana aproximadamente).

2. Efecto de la temperatura en la captación de Fe hem.

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre la absorción de la molécula de hierro hemínico, células Caco-2 fueron expuestas a 4 y 25° C, y se observó la captación tanto de Fe hem como de hierro inorgánico. Como lo muestra la tabla I, existe una diferencia significativa entre la captación de Fe hem a 4 y a 25 °C ($p < 0,001$; ANOVA

de una vía). Como era de esperar, la captación de hierro inorgánico, también presentó una diferencia significativa entre las dos temperaturas ($p < 0,001$; ANOVA de una vía). La mayor diferencia se observa al comparar la captación de Fe hem a 4° C con la de hierro inorgánico a 25° C. Al cabo de una hora de ensayo, la captación a 25° C de Fe hem alcanzó los $19,46 \pm 1,31$ pmoles de Fe/mg de proteína, mientras que a 4° C esta cantidad se vió reducida a $8,64 \pm 1,09$ pmoles de Fe/mg de proteína. El Q_{10} estimado para estos procesos fue de 1,55 para la absorción de hierro hemínico y de 1,30 para la de hierro inorgánico.

<i>Captación de hierro hemínico e inorgánico a 4 y 25°C</i>				
Tiempo (minutos)	Fe-hem 4°C (pmoles/mg proteína)	Fe-hem 25°C (pmoles/mg proteína)	Fe 4°C (pmoles/mg proteína)	Fe 25°C (pmoles/mg proteína)
5	$0,64 \pm 0,05$	$1,3 \pm 0,12$	$2,11 \pm 0,23$	$2,57 \pm 0,21$
10	$1,18 \pm 0,13$	$2,87 \pm 0,21$	$4,75 \pm 0,31$	$6,54 \pm 0,54$
20	$3,75 \pm 0,23$	$6,38 \pm 0,65$	$8,94 \pm 0,94$	$14,2 \pm 1,09$
45	$6,54 \pm 0,57$	$12 \pm 1,03$	$21,17 \pm 1,38$	$31,7 \pm 3,29$
60	$8,64 \pm 1,09$	$19,46 \pm 1,31$	$29,53 \pm 2,65$	$48,4 \pm 3,18$

Tabla I. Efecto de la temperatura en la captación de Fe hem y Fe-NTA. La captación de Fe inorgánico es mayor a la de Fe hem tanto a 4 como a 25° C, sin embargo, ambos procesos disminuyen en forma notoria al reducir la temperatura, se muestra el promedio de los resultados de 3 experimentos con duplicados para el tiempo.

3. Expresión de Hem oxigenasa 1 (HO1) en células Caco-2 incubadas con Fe hem.

La expresión de la enzima HO1, encargada de catalizar la liberación de Fe desde la protoporfirina fue inducida por el aumento del contenido de Fe (Figura 5). Como control de carga se utilizó la misma membrana re-probada con anti-actina. El análisis

densitométrico de esta imagen nos permitió observar una correlación entre el aumento de la expresión de HO1 y la concentración de Fe hem presente en el medio de cultivo (Figura 6).

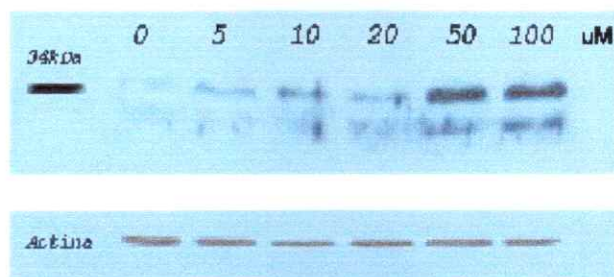


Figura 5. Expresión de HO1 frente a distintas concentraciones de Fe hem. Mediante la técnica de Western blot es posible observar el aumento de la expresión de HO1 en células Caco-2, frente a concentraciones crecientes de Fe hem de 0 a 100 μM en el medio de cultivo, la imagen muestra un gel representativo de 4 realizados.

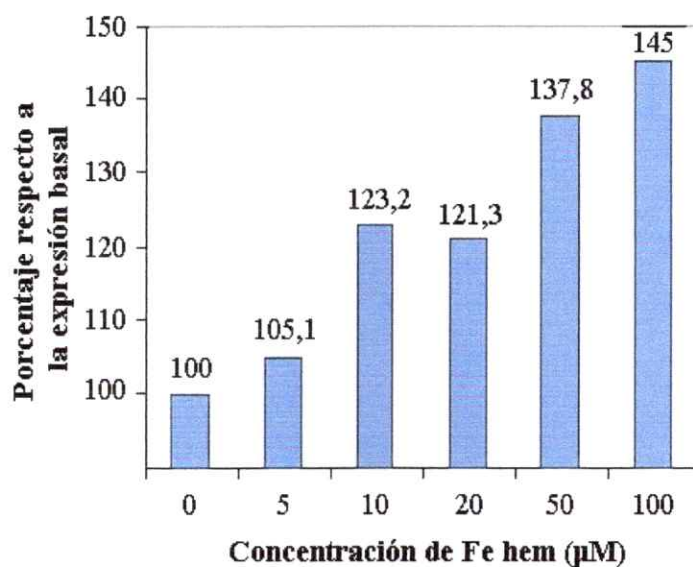


Figura 6. Análisis densitométrico del Western blot para HO1. Usando el programa Scion ImageTM, es posible hacer análisis densitométrico de los resultados del Western blot. Al dividir la densidad de las bandas presentes en cada carril por la de las bandas de actina es posible apreciar el aumento en la expresión de HO1 al aumentar la concentración de Fe hem en el medio. El análisis densitométrico corresponde al mismo gel de la figura 5.

4. Estudios de cinética de captación de Fe hemínico en células Caco 2 sometidas a tratamientos de depleción de potasio y acidificación de citosol.

Con el fin de estudiar la cinética de captación de la molécula de hierro hemínico, realizamos ensayos con hierro hemínico marcado radiactivamente (^{55}Fe) registrando la absorción en función del tiempo en condiciones de depleción de potasio (Larkin y col, 1983) y de acidificación de citosol (Sandvig y col, 1987), procedimientos ambos que producen una inhibición de la endocitosis.

La técnica de depleción de potasio consiste en incubar las células con un tampón hipotónico durante 5 minutos, o bien en un medio isotónico libre de potasio por 3 horas. La depleción de potasio es un proceso reversible ya que la endocitosis se restablece al agregar KCl o RbCl al medio, pero no se restablece en presencia de ouabaína, un bloqueador específico de la Na^+/K^+ ATPasa (Larkin y col, 1983).

La acidificación de citosol se logra exponiendo las células a medio sin suero con ácido acético 10 mM hasta alcanzar pH 5.0 y a diferencia de la depleción de potasio este tratamiento no inhibe el transporte aniónico, no produce encogimiento celular, pero si bloquea la endocitosis de algunos ligandos. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 7, donde se puede apreciar que para ambos tratamientos la captación se reduce en cerca de un 50 por ciento respecto al control. A las 2 horas la captación de las células control es de $84,4 \pm 8,5$ pmoles de Fe/mg de proteína, mientras que al someterlas al tratamiento de depleción de K alcanza los $48,3 \pm 2,1$ pmoles de Fe/mg de proteína y con acidificación de citosol $38,4 \pm 8,3$ pmoles de Fe/mg de proteína. ($p < 0,01$, ANOVA

una vía). Sin embargo, al comparar los grupos entre sí (Test de Tukey) la única diferencia significativa encontrada fue entre las células control y las sometidas a tratamiento de acidificación de citosol ($p < 0,05$).

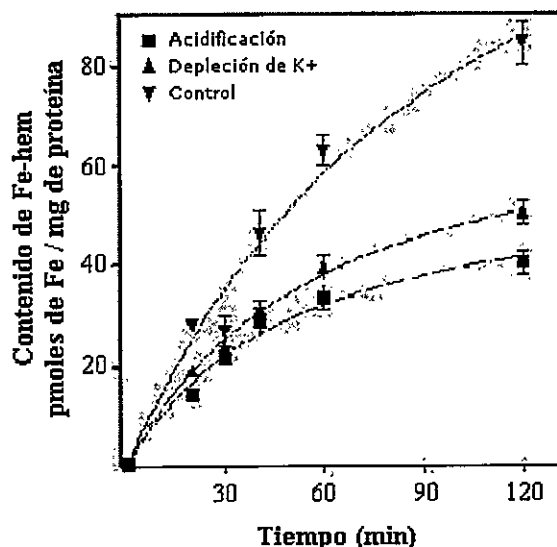


Figura 7. Efecto de la acidificación de citosol y depleción de potasio en la captación de Fe hem por parte de células Caco-2. Captación de Fe hem a través del tiempo en células Caco-2 sometidas a pretratamientos de depleción de potasio, acidificación de citosol, o sin pretratamiento. Se observa una disminución en cerca de un 50% en la captación de la molécula en ambos tratamientos (Cuadrados: Acidificación de citosol, Triángulos: depleción de potasio, Triángulos invertidos: control); $n=3$ con duplicados para cada tiempo.

5. Efecto del calcio en la captación de hierro hemínico.

Una protoporfirina homóloga al Fe hem es la vitamina B12, esta molécula presenta al anillo porfirínico rodeando a un átomo de cobalto en vez de hierro, e ingresa a la célula de epitelio intestinal por endocitosis mediada por receptor, a través del sistema megalina-cubilina (Moestrup & Verroust, 2001). La unión de ligandos a megalina-cubilina necesita la presencia de calcio, y además, se ha observado que al agregar calcio

junto al quelante EDTA, no existe unión específica de ligando (Moestrup & Verroust, 2001; Kozyraki y col, 2001). Con estos antecedentes decidimos observar la conducta de la molécula de Fe hem frente a calcio y en presencia de los quelantes EDTA y EGTA.

En la Figura 8 se observa que, contrariamente a lo ocurrido con B12, la captación de Fe hem al cabo de una hora, se ve inhibida por concentraciones crecientes de calcio ($26,7 \pm 2,8$ pmoles de Fe/mg proteína), y estimulada por la presencia de EDTA ($54,4 \pm 4,9$ pmoles de Fe/mg proteína). En el análisis estadístico, se observó una diferencia significativa en la captación entre las células tratadas con EDTA y las células a cuyo medio de captación se les agregó calcio ($p < 0,01$; ANOVA de dos vías).

Para corroborar que el aumento de la captación producido al agregar quelante es realmente producto de la disminución de calcio, y no de otra sustancia interactuante con el EDTA, utilizamos EGTA un quelante específico de calcio. Como también se aprecia en la Figura 8, las células incubadas en presencia de EGTA presentaron una captación aún mayor a las incubadas con EDTA ($62,2 \pm 5,1$ pmoles de Fe/mg proteína). En el análisis estadístico, se observaron diferencias significativas en la captación de hierro hemínico entre las células tratadas con calcio y con EGTA ($p < 0,05$).

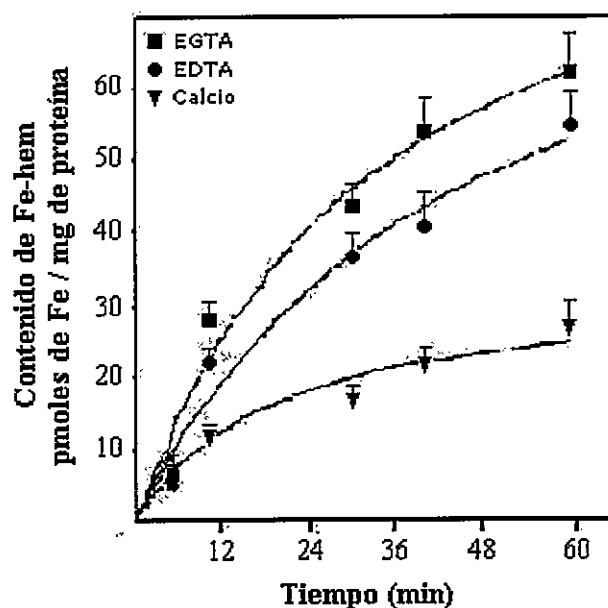


Figura 8. Captación de Fe-hem en células Caco-2 expuestas a calcio, EGTA y EDTA. Células Caco-2 fueron expuestas a calcio 10 μM y a los quelantes EDTA y EGTA (10 μM) en el medio de cultivo. Se puede observar la reducción de la captación a medida que aumenta la concentración de calcio, y la estimulación producida al agregar quelante al medio (Cuadrados: EGTA, Círculos: EDTA, Triángulos Invertidos: Calcio; n=3 con duplicados para cada tiempo).

6. Uso de Drogas inhibitorias de procesos endocíticos como vía de estudio del ingreso de hierro hemínico al interior de células Caco 2.

Para estudiar los sistemas de captación de moléculas a nivel celular, es posible utilizar distintas drogas que bloquean uno o más procesos, ya sea endocitosis dependiente o independiente de clatrina. Dentro de estas drogas disponibles hemos escogido una batería formada por metil- β -ciclodextrina (MBCD), óxido de fenilarsina (PAO), colchicina, citocalasina-D (Cit D), brefeldina-A (BFA) y nocodazol. Un esquema de los mecanismos mediante los cuales actúa cada una de estas drogas es

posible apreciarlo en la Figura 9, mientras que la estructura de cada una de estas moléculas se observa en la Figura 10.

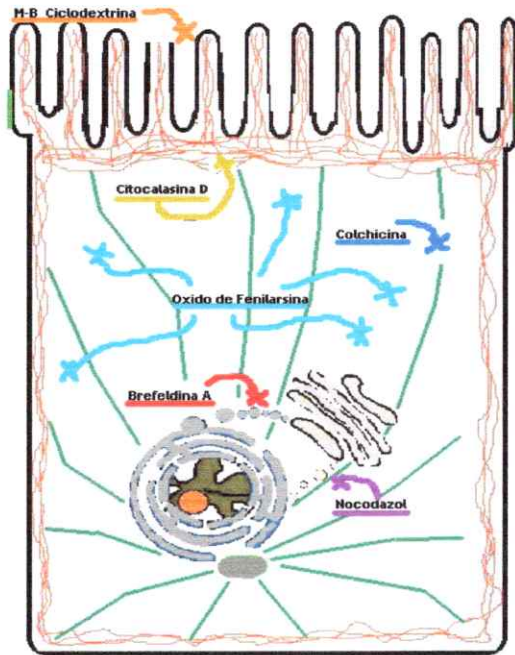


Figura 9. Sitios de acción de las drogas inhibitoras de captación de metabolitos en la célula de epitelio intestinal utilizadas. El color en cada droga indica el lugar de acción. Microtúbulos en verde; Filamentos de actina en rojo. En gris retículo endoplásmico, Golgi y centro organizador de microtúbulos (MTOC).

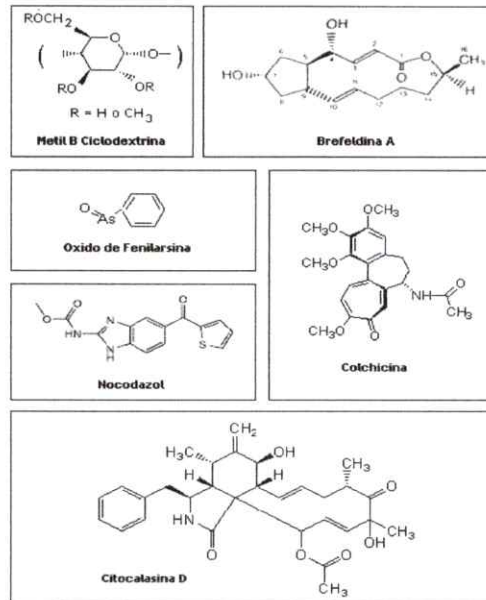


Figura 10. Estructura molecular de las drogas utilizadas.

6.1. Efecto de la depleción de colesterol a nivel de membrana.

Metil-β-ciclodextrina (MBCD) actúa provocando la depleción de colesterol a nivel de membrana, lo que hace a la célula más permeable a iones y pequeños no-electrolitos, también se produce la pérdida de la localización de receptores involucrados en la captación de proteínas y otras moléculas externas (Pike & Miller, 1998; Rodal y col,

1999; Subtil y col, 1999). El tratamiento con este reactivo es reversible, pues su efecto se anula al cultivar las células durante 12 horas en medio completo o 10 horas con metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol (Subtil y col, 1999). La distribución de clatrina no se ve afectada, así como el número de invaginaciones en la membrana, sin embargo éstas se observan planas con respecto a las invaginaciones normales y duran 7 veces más en la membrana (Subtil y col, 1999).

De la misma forma que las vesículas de clatrina, esta droga afecta la estructura y formación de vesículas cubiertas de caveolina (caveolas). En resumen, MBCD afecta la endocitosis dependiente de clatrina y de caveolina (Rodal y col, 1999). Curiosamente, nuestros resultados muestran un aumento en la captación de hierro hemínico al someter a las células a esta droga (Figura 11). Al cabo de 100 minutos de incubación la captación es de $11,4 \pm 0,3$ pmoles de Fe/mg proteína, en comparación con el control que alcanza a $5,1 \pm 0,1$ pmoles de Fe/mg proteína. En el análisis estadístico (ANOVA de dos vías), no se aprecian diferencias significativas ($p > 0,05$) debido a un comportamiento similar de ambas curvas en los primeros tiempos, sin embargo; al comparar puntos sobre los 30 minutos de incubación, se aprecia una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la captación con MBCD y el control.

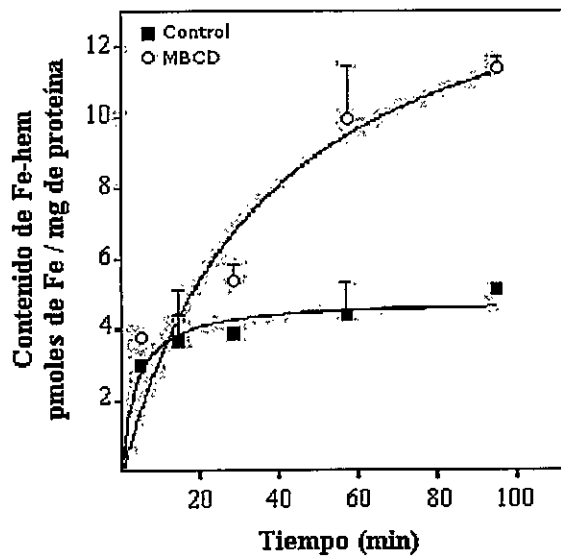


Figura 11. Efecto de la depleción de colesterol a nivel de membrana. Captación de hierro hemínico marcado Fe hem en células Caco-2 tratadas en forma anterior al ensayo con metil-β-ciclodextrina 5 μM, durante 30 minutos. Se puede observar un aumento significativo en la captación de Hem producto de este tratamiento (n=3, con duplicado para cada tiempo).

6.2. Efecto de la disrupción de microtúbulos.

Nocodazol es uno de los agentes antimicrotúbulos usados como droga antitumoral, que inhibe la polimerización de las moléculas de tubulina libres al unirse a un residuo de arginina de la subunidad beta de la tubulina (Decordier y col, 2002; Maples y col, 1997). Los microtúbulos se encontrarían involucrados en el movimiento de vesículas de caveolina a través de la célula, y al tratar con Nocodazol, se produciría un aumento de más de 2 veces en el número de caveolas invaginadas en superficie (Mundy y col, 2002). Al usar esta droga en células Caco-2, no se observa un efecto significativo en la captación de Fe hem (Figura 12). Después de 100 minutos de incubación existe una captación de $7,2 \pm 0,5$ pmoles de Fe/mg proteína, mientras que en las células control la

captación es de $7,7 \pm 0,6$ pmoles de Fe/mg proteína. El test ANOVA de dos vías no registró diferencias significativas ($p > 0,05$).

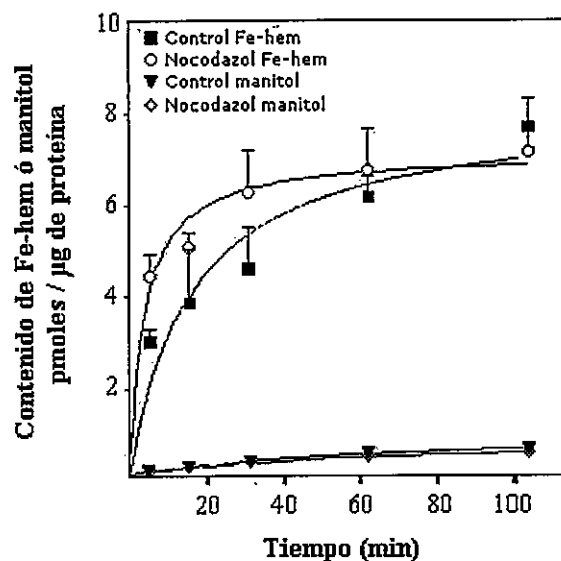


Figura 12. Captación de Fe-hem y manitol en células Caco-2 tratadas con nocodazol como agente disruptor de microtúbulos. Al tratar células Caco-2 con nocodazol no se aprecia un efecto significativo sobre la captación de Fe-hem, ni tampoco variación en la entrada de manitol a la célula, señal de que la permeabilidad de la membrana no se ha visto afectada con esta droga. Como se explicó en la metodología las células fueron pre-tratadas con nocodazol 5 μ M durante 30 minutos ($n=3$, con duplicados para cada tiempo).

Con el fin de conocer la influencia de nocodazol en la estructura celular y la permeabilidad frente a otras sustancias, estudiamos la captación de manitol tritiado en células Caco-2 sometidas al tratamiento con nocodazol. La captación de manitol en células Caco-2 ocurre por flujo junto a solventes, y alteraciones en las uniones estrechas entre células producen un aumento en la entrada de esta sustancia (Parisi y col, 1995). Al tratar con nocodazol la captación a los 100 minutos fue de 0,481 pmoles de manitol/mg proteína, mientras que el control, captó 0,57 pmoles de manitol/mg proteína. Esta

diferencia no fue significativa al análisis estadístico (ANOVA de dos vías, $p > 0,05$) (Figura 12).

Otro inhibidor selectivo del ensamblaje de microtúbulos es colchicina, reacciona con el dímero de tubulina impidiendo que estos se integren al microtúbulo, inhibe la mitosis, y el transporte axonal, funciona de manera inversa al taxol, el cual estabiliza microtúbulos (Boye & Brossi, 1992). La captación fue de $4,4 \pm 0,2$ pmoles de Fe/mg proteína, mientras que las células control al mismo tiempo presentaron una captación de $5,1 \pm 0,1$ pmoles de Fe/mg proteína (Figura 13). Al igual que el nocodazol, no presentó diferencias significativas (ANOVA de dos vías, $p > 0,05$).

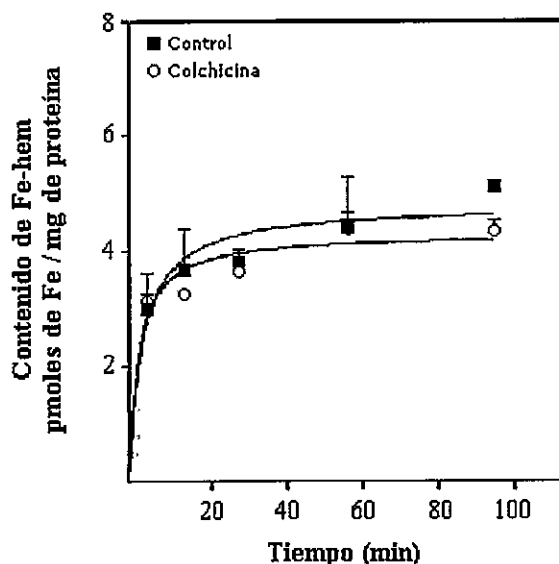


Figura 13. Captación de Fe-hem en células Caco-2 tratadas con colchicina como agente disruptor de microtúbulos La captación de Fe hem después del tratamiento con colchicina $10 \mu\text{M}$ durante 30 minutos, no presentó diferencias significativas comparadas al control, al igual que ocurre con nocodazol (Figura 12), $n=3$ con duplicados de cada tiempo.

6.3. Efecto de la disrupción de filamentos de actina. Citocalasina D es una droga de origen fúngico, permeable a la superficie celular, rompe los filamentos e inhibe la polimerización de actina. Es 10 veces más efectiva que la citocalasina B, y no inhibe el transporte de glucosa a través de la membrana (Rubtsova y col, 1998; Jackman y col, 1994; Maples y col, 1997). Se ha postulado que la actina juega un papel en el proceso de brote de las vesículas de caveolina y clatrina (Mundy y col, 2002), presenta una inhibición de la endocitosis apical, pero no basolateral de dichas vesículas en células Caco-2 (Jackman y col, 1994). Nuevamente, al igual como ocurrió con MBCD (Figura 11), se observa un aumento en la captación de Fe hem al tratar células Caco-2 con citocalasina D (Figura 14). La captación de Fe hem con citocalasina D fue de $16,2 \pm 3,3$ pmoles de Fe/mg proteína, mientras que en las células control fue de $5,1 \pm 0,1$ pmoles de Fe/mg proteína ($p < 0,05$; ANOVA de dos vías).

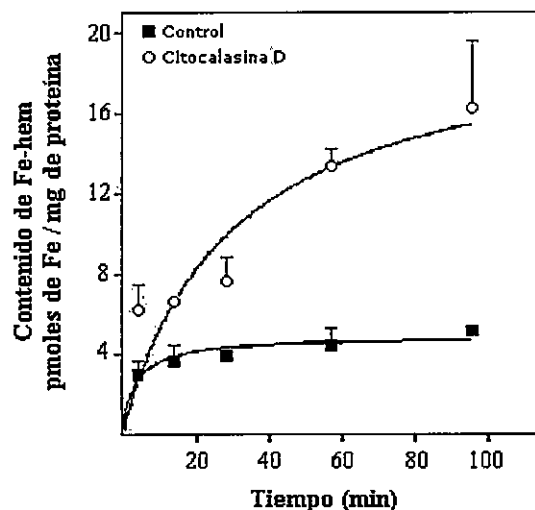


Figura 14. Efecto de la disrupción de filamentos de actina. La exposición de células Caco-2 a citocalasina D $5 \mu\text{M}$ por una hora, en forma previa al ensayo de captación de Fe hem, provoca un aumento significativo en comparación al control, $n=3$ con duplicados por tiempo.

6.4. Inhibición del destinamiento de proteínas entre retículo endoplásmico y Golgi.

Brefeldina A (BFA) es una lactona macrocíclica, aislada inicialmente y caracterizada como un antibiótico antiviral. Retiene proteínas secretorias y de membrana en el retículo endoplásmico, se le ha usado como inhibidor específico del transporte de membranas (Klausner y col, 1992). BFA bloquea la secreción de proteínas, ya que desorganiza el complejo de Golgi. En células tratadas con BFA, el complejo de Golgi desaparece y sus proteínas terminan encontrándose en el retículo endoplásmico (Alberts y col, 1996). Se ha reportado que en algunos casos BFA puede actuar inhibiendo la endocitosis de sustancias desde la membrana apical como heparan sulfato proteoglicanos (Uhlín-Hansen & Yanagishita, 1995) y que no afectaría el reciclaje de proteínas del endosoma a la membrana (Klausner y col, 1992). Nuestros resultados indican un ligero, pero significativo aumento en la captación de Fe hem ($p < 0,05$; ANOVA de dos vías) en células Caco-2 tratadas con BFA, en especial, después de una hora de tratamiento (Figura 15); a los 80 minutos de ensayo, la captación de hierro hemínico en células tratadas con BFA fue de $8,7 \pm 0,7$ pmoles de Fe/mg proteína, mientras que las células control alcanzaron los $6,4 \pm 0,2$ pmoles de Fe/mg proteína.

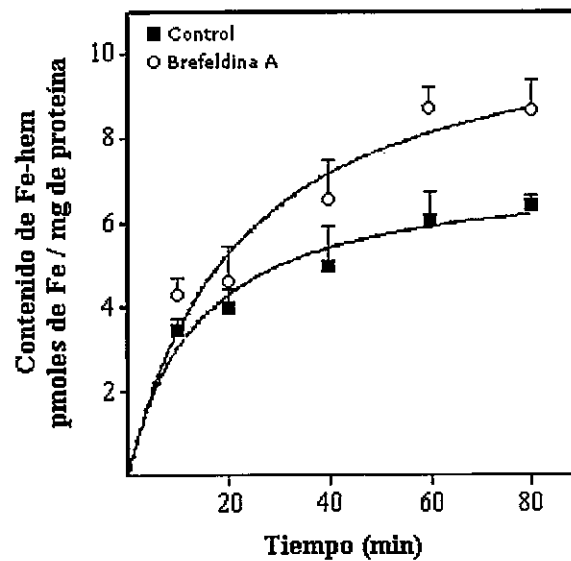


Figura 15. Efecto de la interrupción del destinamiento entre retículo endoplasmático y Golgi. La captación de hierro hemínico con brefeldina A, resultó ser mayor respecto al control sin tratamiento, como se explica en la metodología las células fueron pre-tratadas con BFA 5 μ M durante 2 horas, n=3 con duplicados para cada tiempo.

6.5. Inhibición de la endocitosis por óxido de fenilarsina. El óxido de fenilarsina (PAO) es un inhibidor de fosfotirosin-fosfatasa. En la célula inhibe procesos vitales como la síntesis de ATP, sin embargo se ha observado que el bloqueo de la internalización de moléculas no es producto de la falta de ATP, pues el tratamiento con PAO 10 μ M por 20 minutos bloquea la internalización, pero no altera el contenido de ATP (Gibson y col, 1989; Foley 2005). Por lo anterior, usado en bajas concentraciones permite estudiar la endocitosis de proteínas, sin provocar cambios abruptos en los procesos celulares. Nuestros resultados obtenidos al tratar células Caco-2 con PAO 10 μ M por 30 minutos, muestran un aumento significativo en la captación de Fe hem por parte de estas células ($9,8 \pm 1,2$ pmoles de Fe/mg proteína), respecto al control sin tratamiento ($5,1 \pm 0,1$

pmoles de Fe/mg proteína) ($p < 0,05$; ANOVA dos vías, con comparación múltiple de Holm Sidak) (Figura 16).

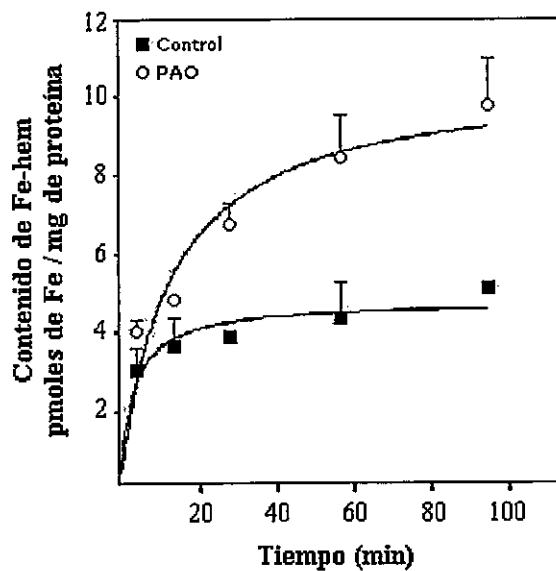


Figura 16. Efecto del óxido de fenilarsina en la captación de Fe-hem de células Caco-2. El tratamiento de células Caco-2 con óxido de fenilarsina (PAO), se traduce en un aumento significativo de la captación de Hem por parte de las células, al igual que ocurre con el uso de citocalasina-D y metil- β -ciclodextrina ($n=3$, con duplicados para cada tiempo).

7. Análisis de la localización de HO-1 a nivel celular, mediante microscopía confocal.

Células Caco-2 fijadas en cubreobjetos fueron observadas al microscopio confocal, con anticuerpos fluorescentes para las proteínas HO1 y S-Glut1 (transportador de glucosa tipo 1), este último usado como marcador de membrana apical. En la Figura 17A se muestran las células control (sin tratamientos), se puede apreciar colocalización de estas dos proteínas en algunos sectores, lo que indica que HO1 se une a membrana o a sectores que se desprenden de ella en procesos endocíticos. Para apreciar como varía esta distribución de HO1 con las técnicas usadas en los ensayos de captación, sometimos células a depleción de potasio y a disrupción de microtúbulos mediante nocodazol. Los resultados se muestran en la Figura 17B, la depleción de potasio (arriba), provocó alteraciones en la estructura celular (arriba derecha) lo cual se tradujo en un aumento de la colocalización de HO1 y S-Glut1. La disrupción de microtúbulos a través del tratamiento con nocodazol antes de la fijación (Figura 17B, abajo) también provocó un aumento en la colocalización, pero esta vez el cambio morfológico experimentado por las células no fue tan severo.

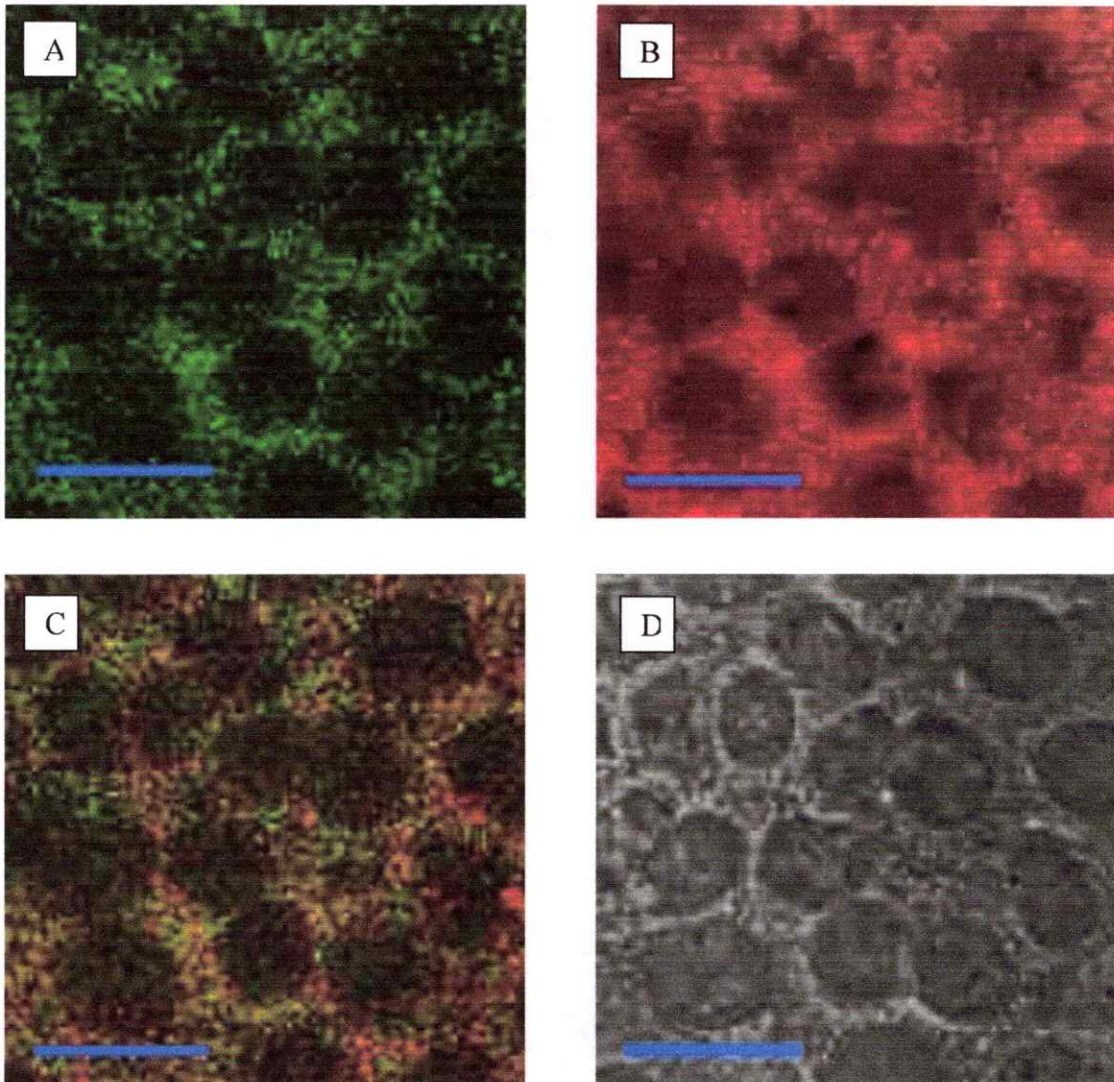


Figura 17A. Imágenes de microscopía confocal. Células Caco-2 incubadas con anticuerpos para HO1 (B, en rojo) y S-Glut1 como marcador de membrana apical (A, en verde), al sobreponer ambos canales es posible apreciar colocalización de estas proteínas en algunos sectores de la membrana (C). El contraste de fase (D), muestra una disposición típica de estas células. La barra azul corresponde a 30 μm .

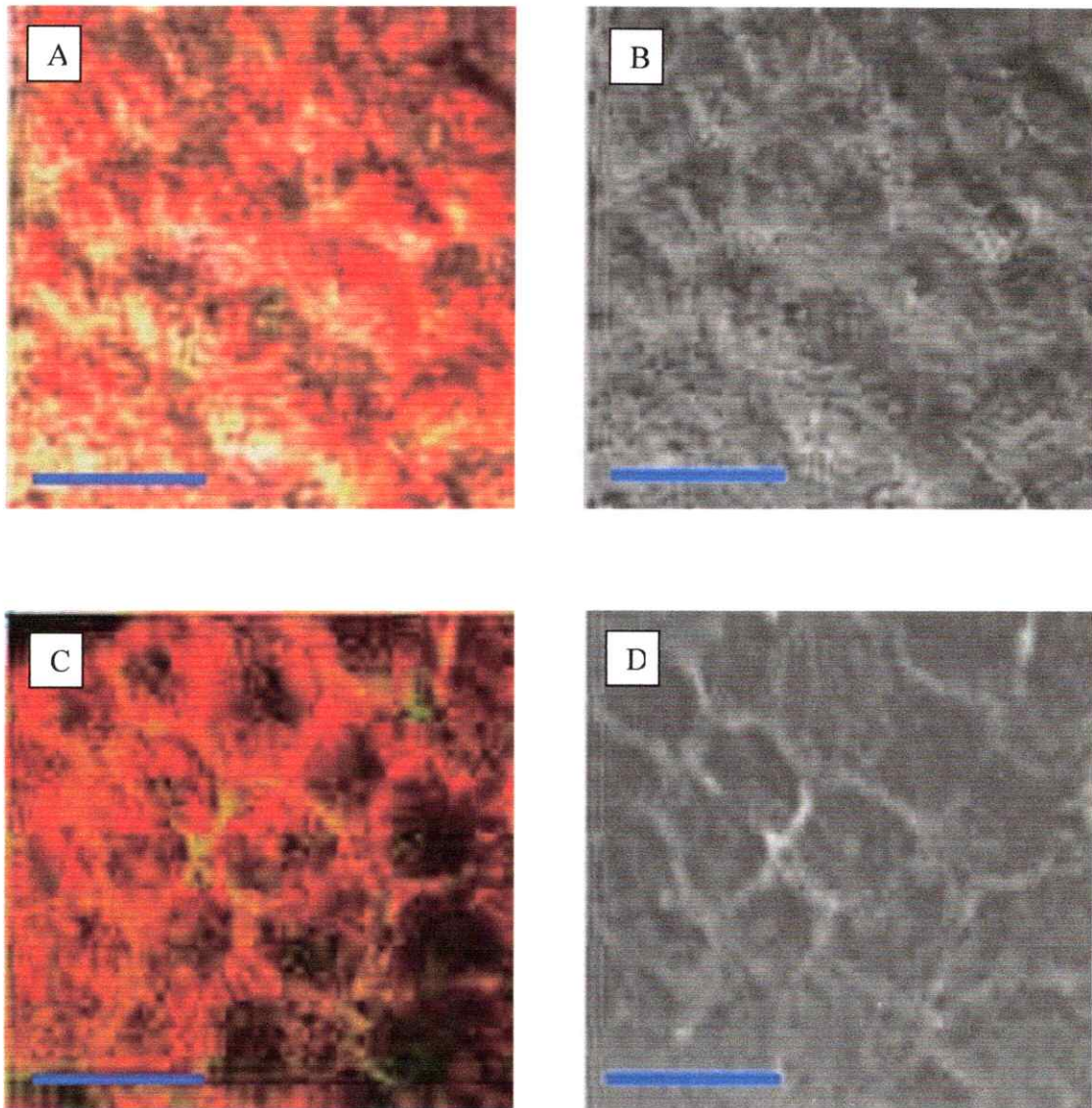


Figura 17B. Imágenes de microscopía confocal y tratamientos de depleción de potasio y disrupción de microtúbulos. Usando los mismos anticuerpos (HO1 en rojo y S-Glut1 en verde) observamos que el tratamiento de depleción de potasio (arriba) provoca alteraciones en la estructura celular (como se observa en el contraste de fase, B) que resultan en un aumento en la colocalización de HO1 y S-Glut1 (A). La disrupción de microtúbulos con el uso de nocodazol (C y D) también provoca un aumento en la colocalización de estas proteínas respecto al control sin ningún tratamiento (fig.17A, C). La barra azul corresponde a 30 μm .

DISCUSION

Al cultivar células Caco-2 con Fe inorgánico y Fe orgánico (ya sea en forma de hemoglobina o hemoglobina digerida) se puede apreciar una mayor absorción de hierro inorgánico, seguido por hemoglobina digerida con pepsina y finalmente, con la menor tasa de absorción, la hemoglobina intacta (Figura 3). Si bien estos datos apuntan a una mejor captación de Fe libre; *in vivo*, el hierro inorgánico presenta una muy disminuida biodisponibilidad en la forma de Fe^{+3} , la cual aumenta al pasar a su estado reducido Fe^{+2} (el Fe^{+2} ingresa al enterocito via el transportador de metales divalentes, DMT1). La entrada de Fe a la célula, para cualquiera de las tres formas utilizadas, es un proceso saturable, hecho que también se puede observar al determinar la concentración intracelular de ferritina (Figura 4), que se comporta del mismo modo que la concentración intracelular de Fe. Esta saturación sólo se aprecia en cultivos celulares ya que, *in vivo*, la única forma cuya captación se saturaría corresponde el Fe hem.

Al variar la temperatura del ensayo de 4 a 25°C, se produce un aumento en la captación tanto de hierro inorgánico como de hierro hemínico, que arroja un Q_{10} estimado de 1,30 y 1,55 para cada proceso, respetivamente. De acuerdo con esto, el hierro inorgánico entraría a la célula a través de canales, debido a que arroja un $Q_{10} < 1,5$ lo cual es un valor típico para este tipo de transporte iónico (Hodgkin y col, 1952; Wadiche & Kavanaugh, 1998); y que corresponde a lo descrito en la bibliografía, ya que el hierro inorgánico ingresa a la célula a través del transportador DMT1. En el caso del hierro hemínico el valor de Q_{10} (1,55) se acerca mas al de un sistema de captación a través de canales que al de un transporte activo (Q_{10} entre 2 y 4).

La exposición de enterocitos a diferentes concentraciones de hem, desencadena cambios en la expresión de la enzima hem oxigenasa 1 (HO1), encargada de catalizar la reacción que termina con la liberación de hierro libre a partir de la molécula de hem (Figuras 5 y 6). El aumento observado en la expresión de HO1 implica que la entrada de Fe hem a la célula está generando una cadena de eventos que terminan con la regulación de la expresión de la proteína mencionada, por lo cual debe existir un mecanismo de regulación de la captación de Fe hem al interior de la célula. Lo mismo se puede desprender del aumento en la concentración intracelular de ferritina (Figura 4). Podemos interpretar que al aumentar el ingreso de hierro hemínico a la célula, este es transformado con mayor velocidad a hierro libre (aumenta la presencia de la enzima que cataliza el proceso), y este aumento en la presencia de hierro libre induce la expresión de ferritina, que jugaría un papel de protección celular, impidiendo un aumento excesivo de hierro libre que es perjudicial para la célula.

La técnica de depleción de potasio intracelular (Larkin y col, 1983), es una técnica agresiva, que afecta varios procesos anabólicos, en particular inhibiendo de forma marcada la síntesis de proteínas y de ADN. Uno de estos efectos observados, consiste en la inhibición de la formación de vesículas endocíticas, y la disminución de la clatrina presente en la membrana sin afectar el agrupamiento de receptores en ésta. La pérdida de la endocitosis mediada por receptor parece ser parte de una respuesta pleyotrópica, pues también existe una disminución de la pinocitosis.

Nuestros resultados muestran una disminución significativa de la captación de Fe hem por parte de células Caco-2, al disminuir el contenido intracelular de potasio

(Figura 7), lo que se puede producir porque la molécula de hem no puede entrar a la célula debido al “secuestro” de las vesículas, o a la disminución en la expresión de una o más proteínas necesarias para la internalización de esta molécula.

Por otra parte, la acidificación de citosol (Sandvig y col, 1987), no altera en forma significativa la síntesis de proteínas, pero estos cambios en el pH podrían provocar trastornos estructurales de las proteínas. Como no se observa variación del número de receptores en la superficie ni de vesículas formadas, se cree que la inhibición del proceso endocítico se produce por un bloqueo del desprendimiento de las vesículas desde la membrana (Sandvig y col, 1987), de esta forma, la disminución de la captación de Fe hem observada con la acidificación del citosol (Figura 7) puede producirse por las mismas dos razones que en el caso de la depleción de potasio: (1) la disminución del tráfico vesicular o (2) ausencia de una proteína funcional necesaria para la captación de hierro hemínico. Sin embargo podemos concluir que el ingreso de la molécula de hierro hemínico a la célula, contrariamente a lo encontrado por otros autores (Liem y col, 1994; Light & Olson, 1990) no sería, al menos exclusivamente, por difusión simple a través de la membrana.

Al estudiar el efecto producido por calcio en la captación de hem (Figura 8), podemos observar un papel inhibitorio de dicho elemento, el que se hace aún más evidente al agregar el quelante específico de calcio, EGTA. Debido a que no se tienen antecedentes de que el calcio juegue un papel inhibitorio en la formación de vesículas endocíticas, sino más bien es indispensable para el ingreso de algunos ligandos a la célula, como la vitamina B12 (Moestrup & Verroust, 2001; Kozyraki y col, 2001),

podemos sugerir que la entrada de hierro hemínico es determinada por una o más proteínas, cuya función se ve afectada por la depleción de potasio y acidificación de citosol, y además por calcio. Ninguna de las técnicas que hemos empleado ha disminuido en forma total la captación de Fe hem. Esto podría explicarse porque los tratamientos no son tan efectivos como para anular por completo la acción de la(s) proteína(s) implicada(s) en la formación de las vesículas endocíticas o recepción de la molécula, o porque existe una vía paralela de ingreso de hierro hemínico a la célula.

La metil- β -ciclodextrina actúa reduciendo la presencia de colesterol en la membrana, lo cual puede afectar propiedades biofísicas de la bicapa (rigidez, grosor o tensión de membrana) que impidan el brote de vesículas desde la membrana plasmática, sin afectar el reciclaje (desde el endosoma a la membrana plasmática). De esta forma, se produce un estancamiento de la internalización de vesículas, y las proteínas recién sintetizadas siguen llegando hasta la membrana apical. Contrariamente a lo esperado, la disminución en la internalización de vesículas produjo un aumento en la captación de hierro hemínico en comparación con células no tratadas con MBCD (Figura 11). Una explicación para este hallazgo podría ser que al menos una de las proteínas involucradas en este proceso no necesita ingresar al citosol para internalizar la molécula en cuestión. Esto se ha visto confirmado al descubrirse la proteína HCP1 (Shayeghi y col, 2005), que funciona como un transportador de hem, y que se estaría acumulando en la membrana apical gracias a la acción de esta droga, lo cual produce el aumento en la captación observado en la Figura 11.

Es conocido que los microtúbulos juegan un papel importante en el tráfico de vesículas, tanto endocíticas como de destinamiento de proteínas entre compartimentos celulares. Al inducir la disrupción de microtúbulos mediante la acción de nocodazol o colchicina, no se observaron cambios significativos en la captación de Hem por parte de células Caco-2 (Figuras 12 y 13), la integridad de la monocapa no se vió alterada al tratar con Nocodazol, ya que la captacion de manitol no presentó diferencias significativas respecto al control (Figura 12). El hecho de que no se aprecie un efecto significativo en la captación de Fe hem tiene la misma base que el aumento que se produce con MBCD (Figura 11), al bloquearse el tráfico de vesículas en ambas direcciones (de membrana a endosoma y del aparato de Golgi a la membrana). La presencia de proteínas en la membrana no se vería afectada, al menos durante el tiempo del ensayo, por lo que no se producen cambios en la captación.

La disrupción de filamentos de actina mediante citocalasina D, a diferencia de lo que ocurre en microtúbulos, no afecta todos los procesos de tráfico vesicular, sino principalmente la internalización de vesículas de clatrina o caveolina desde la membrana apical (Jackman y col, 1994). Citocalasina D no presenta efectos en la endocitosis desde el lado basolateral al apical (Jackman y col, 1994), por lo que es de esperarse que la llegada de proteínas a la membrana apical no se vea afectada, pero sí el reciclaje de proteínas desde ésta, debido al bloqueo de la internalización de vesículas. De acuerdo con estos antecedentes, se esperaría que el tratamiento con citocalasina D provocara un aumento en la captación de Fe hem (nuevamente debido a un aumento de HCP1 en la membrana apical), lo cual coincide con nuestros resultados (Figura 14).

Al tratar las células con brefeldina A, observamos un ligero aumento en la captación de hem, comparado con el control sin tratamiento. Sin embargo, este aumento solo se hace significativo después de una hora de incubación (Figura 15). Si bien sabemos que la BFA juega un papel disruptor del aparato de Golgi, lo que impediría la llegada de proteínas recién sintetizadas a la membrana, también es preciso notar que el reciclaje de proteínas no se ve afectado por BFA (Klausner y col, 1992). Este es el caso del reciclaje de transferrina, que no se ve alterado, y de la extracción de hierro a partir de ésta (Klausner y col, 1992). Por otra parte, BFA inhibe la endocitosis de heparan sulfato proteoglicanos, (que se cree están involucrados en procesos de interacciones célula-matriz y en procesos de captación de varios factores de crecimiento) presentes en la superficie celular de la mayoría de las células de mamíferos (Uhlin-Hansen & Yanagishita, 1995). De acuerdo a estos antecedentes, el aumento en la captación de Fe hem observado en este ensayo, puede explicarse por un aumento de HCP1 en la membrana apical, pero ocasionado no por la llegada de proteínas recién sintetizadas, sino por la mantención del reciclaje y la disminución de la endocitosis desde la membrana apical.

El óxido de fenilarsina, inhibidor de endocitosis, al igual que las drogas anteriores, produce un aumento en la captación de hierro hemínico (Figura 16). Este resultado puede explicarse por un aumento de la concentración de la proteína transportadora de Hem (HCP1), en la membrana. El uso en bajas concentraciones de PAO (10 μ M) implica que el efecto sobre la concentración intracelular de ATP no tiene mayor relevancia en esta inhibición del proceso endocítico (Gibson y col, 1989).

De acuerdo con lo observado en las imágenes de microscopía confocal, HO1 interactúa con la membrana apical o con vesículas endocíticas de esta, debido a que colocaliza con el transportador S-Glut1 en células Caco-2 (Figura 17A). De la misma forma, al alterar la estructura celular como ocurre con la depleción de potasio, que induce una disminución del volumen celular, la disposición de HO1 al interior de la célula se ve afectada, aumentando la colocalización (Figura 17B, arriba). Esto mismo sucede, pero en menor medida, cuando se tratan las células con nocodazol, como agente disruptor de microtúbulos (Figura 17B, abajo). Se observa también un aumento de la colocalización, pero no tan intenso en este caso, ni la estructura celular se afecta tanto como en el caso de la depleción de potasio. El hecho de que la hem oxigenasa interactúe con proteínas presentes en la membrana, confirma la idea de que esta enzima degrada la molécula de hem en compartimentos microsomales cerrados desde donde es liberado posteriormente el hierro libre.

CONCLUSIONES

Estos resultados confirman nuestra hipótesis inicial de que: “la entrada de hierro hemínico a la célula de epitelio intestinal se encuentra regulada por una o más proteínas presentes en la membrana (como HCP1), y responde a estímulos como cambios de temperatura, a la concentración de ligando u otros elementos en el medio (como calcio) y que se ve afectada al interrumpir o alterar su tráfico y destino, o a cambios de la composición de la propia membrana”.

Los resultados generales del uso de esta batería de drogas y de otros tratamientos inhibidores de la endocitosis para estudiar la captación de Hem en células Caco-2, nos lleva a la conclusión de que si bien el ingreso de hierro hemínico mediado por HCP1 no es su única forma de internalización a la célula (Shayeghi y col, 2005), ésta juega un rol preponderante en la captación del hierro hemínico, independiente del que pudiera ingresar a la célula a través de otros procesos endocíticos específicos o inespecíficos.

El efecto inhibitor del calcio en la captación de Fe hemínico, nos lleva a la pregunta de si este ión actúa sobre el transportador HCP1 o sobre la(s) otra(s) vías de ingreso de hem a la célula, debido al importante papel que juega HCP1. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el calcio de alguna forma afecta el funcionamiento de HCP1. Estos resultados sugieren la conveniencia de estudiar el efecto del calcio dietario en individuos con problemas metabólicos relacionados con hierro tales como la anemia o la hemocromatosis.

Sobre la base de nuestros resultados hemos propuesto un modelo de la entrada de la molécula de Fe hem al enterocito, este constaría de dos vías paralelas (Figura 18): (a) vía HCP1; que consideramos la principal, y (b) probable proceso de pinocitosis con la molécula de Fe hemínico disuelta en el medio o adherida a membrana, de manera inespecífica. Una vez en la célula, el Fe hem es degradado por la hem oxigenasa en compartimentos microsomales desde donde el Fe es liberado al citosol, formando parte del reservorio de hierro lábil de la célula junto con el Fe libre que ingresa a través del transportador DMT1. En la célula, el Fe^{2+} puede pasar a la reserva de hierro de la célula (ferritina) o salir a través de la ferroportina hacia la circulación. El Fe^{2+} pasa a Fe^{3+} por la acción de una ferroxidasa ubicada en la cara basolateral de la célula de epitelio intestinal, lo que posibilita su captura por parte de la transferrina.

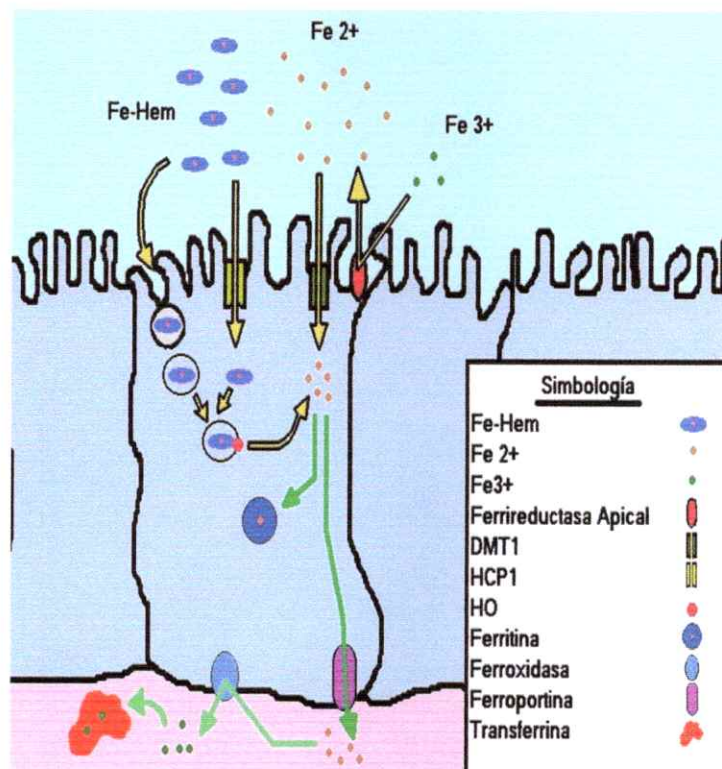


Figura 18. Modelo de la captación de hierro en células intestinales. El hierro entra a la célula en forma de Fe hem a través de HCP1 y de otra vía que podría ser pinocitosis, mientras que el hierro libre ingresa a la célula a través de DMT1, y en su forma Fe²⁺.

BIBLIOGRAFÍA

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. 1996. Transporte de moléculas pequeñas a través de la membrana. *En Biología Molecular de la Célula*, 3ª Edición. pp 541-587, Ed. Omega, Barcelona, España.

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

Alvarez-Hernández X., Smith M., Glass J. 1994. Regulation of iron uptake and transport by transferrin in Caco-2 cells an intestinal cell line. *Biochim et Biophys Acta* 1192: 215-222.

Arredondo M., Orellana A., Núñez M.T. 1997. Intracellular iron regulates iron regulatory protein activity and iron absorption in intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Am J Physiol.* 273: G275-G280.

Arturson P. 1990. Epithelial transport of drugs in a cell culture: a model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive Caco-2 cells. *J Phar Sci.* 79: 476-482.

Audus K., Bartel R., Hidalgo I., Borchardt R. 1990. The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharmac Res.* 7: 435-451.

Boye O., Brossi A. 1992. The alkaloids. *En Brossi and Cordell Eds.*, Vol 41, pp 125-178, Acad Press, Nueva York, USA.

Conrad M., Umbreit J. 2002. Pathways of iron absorption. *Blood Cells Molec and Dis.* 29: 336-355.

Crichton, R. 1991. *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism.*, pp 29-58, Ellis Horwood Ltd., West Sussex, England.

Decordier I., Dillen L., Cundari E., Kirsch-Volders M. 2002. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitor of microtubules. *Mutag.* 17(4): 337-344.

Fleming P., Sly W. 2002. Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. *Ann. Rev Physiol.* 64: 663-680.

Fogh J., Wright W., Loveless J. 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Nat Cancer Ins.* 58: 209-214.

Foley K., De Frutos S., Laskovski K., Tegge W., Dostmann W. 2005. Culture conditions influence uptake and intracellular localization of the membrana permeable c-GMP-dependent protein kinase inhibitor DT-2. *Frontiers in BioSc.* 10: 1302-1312.

Forrelat M., Gautier du Defaix H., Fernandez H. 2000. Metabolismo de hierro. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemter.* 16: 149-160.

Gibson A., Noel R., Herlihy J., Ward W. 1989. Phenylarsine oxide inhibition of endocytosis: effects on asialofetuin internalization. *Am J Physiol Cell Physiol.* 257: C182-C184.

Grasbeck R., Majuri R., Kouvonen I., Tenhunen R. 1982. Spectral and other studies on the intestinal haem receptor of the pig. *Biochem Biophys Acta* 700: 137-142.

Halberg L., Bjomm-Rasmush E. 1972. Determination of iron absorption from the whole diet. A new two-pool model using two radioiron isotopes given as haem and non-haem iron. *Scand J Haematology.* 9: 193-197.

Hediger M., Rolfs A., Goswami T. 2002. Iron transport and hemochromatosis. *J Investig Med.* 50: 239S-246S.

Hidalgo I., Raub T., Borchardt, R. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroint.* 96: 736-749.

Hodgkin A., Huxley A., Katz B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol.* 116: 424-448.

Jackman M., Shurety W., Ellis J., Luzio J. 1994. Inhibition of apical but not basolateral endocytosis of ricin and folate in Caco-2 cells by cytochalasin D. *J Cell Science.* 107: 2547-2556.

Klausner R., Donaldson J., Lippincott-Schwartz J. 1992. Brefeldin A: Insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol.* 116(5): 1071-1080.

Kozyraki R., Fyfe J., Verroust P., Jacobsen C., Dantry-Varsat A., Gburek J., Willnow T., Christensen E., Moestrup S. 2001. Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *PNAS* 98: 12491-12496.

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

Liem H., Noy N., Muller-Eberhard U. 1994. Studies on the efflux of heme from biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 1194: 264-270.

Light W.R., Olson J. 1990. Transmembrane movement of heme. *J Biol Chem*. 265: 15623-15631.

Lippard S., Berg J. 1994. Principle of bioinorganic chemistry, pp 2-6, 21-41. University Science Books. Mill Valley, CA, USA.

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

Mahraoui L., Bousset M., Dissaulx E., Darmoul D., Zweibaun A. 1992. Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine and colon. *Gastrointest Liver Physiol*. G312-G318.

Maples C., Ruiz W., Apodaca G. 1997. Both microtubules and actin filaments are required for efficient postendocytotic traffic of the polymeric immunoglobulin receptor in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*. 272: 6741-6751.

McCord J. 1998. Iron, free radicals and oxidative injury. *Semin Hematol*. 35: 5-12.

Mellman I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 12: 575-625.

Miller D.D., Schricker B.R., Rasmussen R.R., Van Campen D. 1981. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr*. 34: 2248-2256.

Miret S., Simpson R., McKie A. 2003. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu Rev Nutr*. 23: 283-301.

Moestrup S., Verroust P. 2001. Megalin and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr*. 21: 407-428.

Mundy D., Machleidt T., Ying Y., Anderson R., Bloom G. 2002. Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sc*. 115: 4327-4339.

Núñez M.T., Garate M., Arredondo M., Tapia V., Muñoz P. 2000. The cellular mechanisms of body iron homeostasis. *Biol Res.* 33: 133-142.

Núñez M.T., Tapia V., Arredondo M. 1996. Intestinal epithelia (Caco-2) cells acquire iron through the basolateral endocytosis of transferrin. *J Nutr.* 126: 2151-2158.

Parisi M., Pisam M., Calamita G., Gobin R., Toriano R., Bourguet J. 1995. Water pathways across a Reconstituted Epithelial Barrier Formed by Caco-2 Cells: Effects of Medium Hypertonicity. *J. Membrane Biol.* 143: 237-245.

Parmley R., Barton J., Conrad M., Austin R., Holland R. 1981. Ultrastructural cytochemistry and radioautography of hemoglobin-iron absorption. *Exp Mol Pathol.* 34: 131-144.

Peterson M., Mooseker M. 1993. An in vitro model for the analysis of intestinal brush border assembly. I. Ultrastructural analysis of cell-contact induced brush border assembly in Caco-2 cells. *J Cell Sci.* 105:445-460.

Pike L., Miller J. 1998. Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol biphosphate and inhibits hormone-estimated phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem.* 273: 22298-22304.

Pitt A., Gabriels J., Badmington F., McDowell J., González L., Waugh M. 1987. Cell culture on a microscopically transparent microporus membrane. *Biotechniques* 5: 167-170.

Rodal S., Skretting G., Garred O., Vilhardt F., Van Deurs B., Sandvig K. 1999. Extraction of cholesterol with Methyl- β -cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Molec Biol Cell.* 10: 961-974.

Rubtsova S., Kondratov R., Kopnin P., Chumakov P., Kopnin B., Vasiliev J. 1998. Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53. *FEBS Letters* 430: 353-357.

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

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

Subtil A., Gaidarov I., Kobylarz K., Lampson M., Keen J., McGraw T. 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *PNAS.* 96: 6775-6780.

Uhlin-Hansen L., Yanagishita M. 1995. Brefeldin A inhibits the endocytosis of plasma-membrane-associated heparan sulphate proteoglycans of cultured rat ovarian granulosa cells. *Biochem J.* 310: 271-278.

Wadiche J., Kavanaugh M. 1998. Macroscopic and microscopic properties of a cloned glutamate transporter/chloride channel. *J Neurosci.* 18: 7650-7661.

Worthington M., Cohn S., Miller S., Luo R., 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.

Wyllie J., Kaufman N. 1982. An electron microscope study of heme uptake by rat duodenum. *Lab Invest.* 47: 471-476.