

UCH-FC
Biotecnol.
Molecular
E773
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
ESCUELA DE PREGRADO

**“PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL
OXÍGENO EN LA ENDOCITOSIS DEL TRANSPORTADOR DMT1
INDUCIDA POR EL HIERRO DURANTE EL PROCESO DE
ABSORCIÓN 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

por

ANDRÉS L. ESPARZA MARTÍNEZ

Dr. Marco Tulio Nuñez G.
Director del Seminario de Título

Junio de 2011
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. **Andrés Esparza Martínez**.

“PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LA ENDOCITOSIS DEL TRANSPORTADOR DMT1 INDUCIDA POR EL HIERRO DURANTE EL PROCESO DE ABSORCIÓN INTESTINAL”

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

Dr. Marco Tulio Nuñez González
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Michael Handford
Presidente Comisión

Dra. Cecilia Vergara Montecino.
Evaluadora

Santiago de Chile, Junio de 2011



Mi nombre es Andrés L. Esparza Martínez. Nací en Santiago, el 16 de Febrero de 1979. Estudié mi enseñanza básica desde 1^{ero} hasta 6^{to} en el Colegio El Greco de la comuna de Pedro Aguirre Cerda. Posteriormente ingresé al Instituto Nacional donde completé mi enseñanza media eligiendo el área de Biología. Tras rendir la extinta PAA ingresé a estudiar la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, donde diversos caminos me han llevado a explorar mis inquietudes científicas con la mayor libertad. Finalmente, y tras varios giros del destino, he podido hoy terminar esta etapa que me permite cerrar un ciclo y enfrentar el futuro con el mayor optimismo.

*Dedicado a mi familia,
en especial a Estefanía y Helena.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Laboratorio de Biología del Envejecimiento y del Hierro, en especial a mi tutor Marco Tulio Núñez, que siempre me ha apoyado.

Muchas gracias a Cecilia Vergara y Michael Handford por sus comentarios y sugerencias.

A los integrantes del Laboratorio, Vicky, Pabla, Natalia, Pame, Alexis y Carlitos, por su buena disposición y porque siempre he podido contar con ellos.

Agradezco también a los amigos más cercanos quienes contribuyeron a la concreción de este trabajo: Alexander Vergara, César Díaz, Francisco Araya y Ricardo Fuentes. También a Omar Ramírez, Rodrigo Díaz, Pablo Vargas y Cristian Undurraga.

Un gran agradecimiento al club social y deportivo OPA FC y a todos sus integrantes.

Y finalmente el agradecimiento más importante a toda mi familia, a mi Papá, mis hermanos y a la Mamita Teresa; a Estefanía por su apoyo incondicional y paciencia; y a la Helena que día a día me motiva para seguir adelante.

FINANCIAMIENTO

Financiado por el proyecto ICM-P05-001-F de la Iniciativa Científica Milenio

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
FINANCIAMIENTO.....	v
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Reactivos generales.....	12
Equipos utilizados.....	12
Sondas fluorescentes.....	12
Cultivo celular.....	12
Preparación de las soluciones de Fe ⁺² y Fe ⁺³	14
Agentes que afectan el tono redox usadas en las preincubaciones.....	14
Biotinilación selectiva de proteínas de superficie.....	15
Preparación de extractos celulares.....	16

Determinación de la concentración de proteínas.....	16
Preparación de la streptoavidina unida a esferas de agarosa y precipitación.....	17
Preparación de las muestras precipitadas.....	18
Geles de poliacrilamida y transferencia a membranas de nitrocelulosa.....	18
Anticuerpos.....	19
Inmunodetección.....	20
Determinación de la entrada de hierro y producción de ROS intracelulares.....	21
Programas utilizados.....	22
Análisis estadístico.....	22
RESULTADOS.....	23
1. Determinación de la cinética de internalización de DMT1+IRE en las membranas apicales a lo largo del tiempo, en condiciones basales y tras la aplicación de hierro apical.....	23
2. Determinación en células Caco-2 de la producción de ROS tras la adición de hierro.....	27
3. Efecto del antioxidante general NAC en la endocitosis de DMT1+IRE inducida por hierro.....	34
4. Efecto del atrapador de radicales hidroxilo DMSO en la endocitosis de DMT1+IRE inducida por hierro.....	36
5. Efecto de superóxido dismutasa y catalasa en la endocitosis de DMT1+IRE inducida por hierro.....	38
6. Efecto de la administración de peróxido de hidrógeno en la endocitosis de DMT1+IRE.....	39
DISCUSIÓN.....	41
PROYECCIONES.....	50
RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	53

PRESENTACIÓN EN CONGRESO.....	55
REFERENCIAS.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	La oferta de hierro induce cambios notables en la distribución de DMT1.....	6
Figura 2.	Modelo de estudio.....	10
Figura 3.	Cinética de internalización de DMT1+IRE inducida por la oferta de hierro.....	24
Figura 4.	Entrada de hierro a células Caco-2.....	27
Figura 5.	Determinación de las constantes de velocidad de apagamiento de calceína y su dependencia de la concentración de hierro.....	29
Figura 6.	Generación de ROS inducida por el hierro entrante.....	31
Figura 7.	Velocidades iniciales de producción de ROS inducidas por la oferta de hierro.....	33
Figura 8.	El antioxidante general NAC bloquea la endocitosis de DMT1+IRE inducida por hierro.....	35
Figura 9.	El atrapador del radical hidroxilo DMSO bloquea la endocitosis de DMT1+IRE inducida por hierro.....	37
Figura 10.	La preincubación con SOD y catalasa no bloquea la endocitosis de DMT1+IRE inducida por hierro.....	39
Figura 11.	La incubación con peróxido de hidrógeno recrea la endocitosis de DMT1+IRE.....	40
Figura 12.	Esquema resumen.....	43
Figura 13.	Esquema con la secuencia aminoacídica humana de las cuatro isoformas del transportador DMT1.....	47

ABREVIATURAS

Asc	ácido ascórbico
BCA	ácido bicinconínico
BSA	albúmina de suero bovino
Caco-2	línea celular humana de carcinoma de colon
Cu ⁺²	cobre
DCDHF-DA	2', 7'-diclorodihidro fluoresceína-diacetato
dH ₂ O	agua desionizada
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetil sulfóxido
DMT1	transportador de metales divalentes
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
FAS	sulfato de amonio ferroso
Fp	ferroportina
Fe	hierro
Fe-S	núcleos de hierro-azufre
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
hrs	horas
IRE	elementos de respuesta a hierro de mRNA
kDa	kiloDalton
LIP	pool de hierro lábil

mins	minutos
NAC	N-acetil-L-cisteína
NTA	ácido nitrilotriacético, N,N-bis[carboximetil]glicina
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
RCF	fuerza gravitacional
ROS	especies reactivas del oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
SOD	superóxido dismutasa
SFB	suero fetal bovino
Tween20	polioxietilen sorbitan monolaurato

RESUMEN

Antecedentes recientes en la literatura y observaciones de nuestro laboratorio demuestran que durante el proceso de absorción intestinal el hierro induce la endocitosis del transportador de hierro DMT1. Se ha postulado que este fenómeno es parte del proceso normal del flujo transepitelial de hierro, mientras que nosotros proponemos que es una respuesta regulatoria por la cual se reduce en forma rápida el flujo de hierro a través del epitelio, limitando la absorción intestinal cuando existe una oferta de hierro en exceso (bloqueo mucosal). En la actualidad no existe acuerdo con respecto a estas dos posibilidades. Además, se desconoce el mecanismo que inicia la internalización de DMT1.

En este trabajo, investigamos la participación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas por el hierro en el establecimiento de esta respuesta. Utilizamos células Caco-2 polarizadas crecidas en insertos bicamerales, un modelo *in vitro* de epitelio intestinal.

Mediante biotilación selectiva de proteínas de superficie, determinamos el curso temporal de la internalización de DMT1 inducida por hierro. También determinamos que la producción de ROS intracelulares inducida por hierro fue necesaria para gatillar la endocitosis de DMT1. La inhibición de las ROS inducidas por hierro mediante la coincubación con el antioxidante general N-acetil-L-cisteína (NAC) y con el atrapador del radical hidroxilo DMSO, bloqueó completamente la endocitosis inducida por hierro. Más aún, la internalización de DMT1 fue inducida por peróxido de hidrógeno.

Investigando la posible participación de ROS extracelulares producidas por hierro, encontramos que la internalización de DMT1 no fue inhibida al adicionar al medio extracelular los atrapadores de ROS, catalasa y superóxido dismutasa, resultado consistente con un efecto de ROS intracelulares.

En conjunto, nuestros resultados indican que las ROS intracelulares producidas por la captación de hierro inducen rápidamente la endocitosis de DMT1. Esto podría ser un mecanismo de respuesta rápida que logra evitar una absorción excesiva de hierro tras una ingesta con altos contenidos de hierro.

Nuestros resultados predicen que la presencia de antioxidantes en la dieta podría aumentar la incorporación intestinal de hierro.

ABSTRACT

Evidence from the literature and observations from our laboratory have shown that iron induces DMT1 endocytosis in the intestinal absorption process. It has been postulated that this phenomena is the normal process by which the transepithelial flux of iron from apical to the basolateral membrane occurs, while recently we have proposed that this process could be a regulatory response, which could rapidly down-regulate the flux of iron through epithelia, limiting intestinal absorption when iron is in excess (mucosal block). At present there is no agreement between these two possibilities. Furthermore, the mechanism that initiates DMT1 relocation is unknown.

In this work, we investigated the participation of iron-induced reactive oxygen species (ROS) in the establishment of this response, in a cellular model of intestinal absorption.

By means of selective surface protein biotinylation of polarized Caco-2 cells grown in bicameral inserts, we determined the DMT1 internalization kinetics induced by iron. We then determined that intracellular ROS production induced by iron uptake was necessary to trigger DMT1 endocytosis. Inhibiting iron-induced ROS increase by coincubation with the general antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) or with the hydroxyl scavenger DMSO, completely blocked iron-induced DMT1 endocytosis. Moreover, DMT1 internalization was induced by the permeant oxidant hydrogen peroxide.

In investigating the possible participation of extracellular iron-induced ROS we found that DMT1 internalization was not inhibited by addition to the extracellular

medium of ROS scavengers catalase or superoxide dismutase. These results are consistent with an effect of intracellular ROS.

Together, our results shown that intracellular ROS produced by iron uptake induce DMT1 endocytosis. This is possibly a fast-response mechanism to avoid excessive iron absorption after a meal containing high levels of iron.

Our results predict that the presence of antioxidants in the meal should enhance intestinal iron uptake.

INTRODUCCIÓN

El hierro es un nutriente estrictamente requerido para la gran mayoría de las formas de vida, porque forma parte estructural de una amplia gama de proteínas y enzimas claves como hemoglobina, mioglobina y varios constituyentes de la cadena transportadora de electrones, además de otras proteínas con núcleos Fe-S involucradas en regulación transcripcional, estabilización estructural y catálisis (Beinert y Kiley, 1999; Johnson DC y cols., 2005). En la mayoría de estas proteínas, el hierro participa en reacciones biológicas de intercambio de electrones, gracias a su capacidad de coordinación, la cual le permite alternar entre su forma reducida (+2) y oxidada (+3) a pH fisiológico. Estas características lo hacen un metal muy reactivo, por lo que en exceso o libre de la unión a proteínas específicas, es decir en estado redox activo, cataliza la generación de ROS, resultando en daño a lípidos, DNA y proteínas (Valko y cols., 2004; Valko y cols., 2005; Hawkins y cols., 2009). El hierro que no está unido con alta afinidad a proteínas específicas se encuentra unido con baja afinidad a componentes celulares de bajo peso molecular como fosfatos y nucleótidos además de a grupos hidroxilos, aminos y sulfidrilo (Núñez y cols., 2010), constituyendo el pool de hierro lábil (LIP) (Breuer y cols., 2008). Se ha demostrado que la concentración del LIP es proporcional a la tasa de generación de ROS celular (Breuer y cols., 2008).

Evidencia muy reciente indica que las especies reactivas producidas por el hierro, podrían no sólo ser una fuente potencial de daño celular, sino además, definir el funcionamiento de muchas proteínas que poseen residuos aminoacídicos susceptibles de ser oxidados o reducidos; y cuyo estado de oxidación define si estas proteínas se

encuentran activas o inactivas. Este campo de estudio es denominado señalización redox (Weissenberg y cols., 2010; El-Najjar y cols., 2010). El hierro transportado, mediante la generación de ROS, podría activar cadenas de transducción de señales comandadas por este tipo de proteínas, al influir sobre el estado redox celular (Dröge 2002; Núñez y cols., 2004; Hidalgo y cols., 2007).

La producción de ROS dependiente del hierro y las funciones del LIP son particularmente importantes en linajes celulares que deben manejar cantidades excepcionalmente elevadas de hierro como las células del duodeno especializadas en su absorción; además de las células hepáticas y del sistema reticuloendotelial especializadas en su almacenaje (Dunn y cols., 2007; Graham y cols., 2007; Knutson y Wessling-Resnick, 2003).

Debido a que el hierro en exceso puede ser tóxico y a que su presencia en el LIP influencia importantemente el estado redox celular, es que se ha generado un control estricto de su ingreso, movilización interna y acumulación en tejidos de depósito.

El transportador de entrada, DMT1

DMT1 (Divalent Metal Transporter 1), también denominado Slc11a2 y Nramp2 (Gunshin y cols., 1997; Hubert y Hentze, 2002), es el transportador que permite la entrada de hierro a las células mediante un mecanismo electrogénico de co-transporte $\text{Fe}^{2+}/\text{H}^+$. Es una proteína altamente hidrofóbica con 12 segmentos transmembrana y modificada post-traduccionalmente mediante N-glicosilación. Su topología en la membrana define 6 loops hacia el exterior o lumen y 5 loops citosólicos, encontrándose

el árbol de azúcares en el cuarto loop exterior. Los extremos amino y carboxiterminales se orientan ambos hacia el citosol (Czachorowski y cols., 2009), (Figura 13).

Existen 4 isoformas conocidas de este transportador, existiendo isoformas +IRE y -IRE, por modificación en el carboxilo terminal mediante empalme alternativo, así como formas 1A y 1B, por uso alternativo de dos secuencias AUG en marco de lectura en la región 5' del gen de DMT1 (Figura 13). Estas cuatro isoformas parecen tener idéntica capacidad de transporte de hierro (Tabuchi y cols., 2002), pues comparten el núcleo proteico responsable del transporte y sólo difieren en los extremos amino y carboxilo terminales. Las diferencias en los extremos amino y carboxilo parecen conferir a las distintas isoformas propiedades de tráfico particulares. El caso más estudiado es el de las isoformas +IRE y -IRE de DMT1, las cuales han mostrado distintas localizaciones subcelulares (Tabuchi y cols., 2002) y presentan diferencias en sus tasas basales de endocitosis y reciclaje (Lam-Yuk-Tseung y Gros, 2006). En contraste, no existen datos concluyentes acerca de las diferentes propiedades de tráfico que poseen las isoformas 1A y 1B. La isoforma 1B parece ser expresada en la mayoría de los tejidos, mientras que la isoforma 1A muestra ser tejido específica con la expresión más alta en duodeno y riñón y la expresión más baja en testículos y otras partes del tracto gastrointestinal (Hubert y Hentze, 2002). Interesantemente, las isoformas +IRE y -IRE son expresadas en conjunto en la mayoría de los tejidos y órganos testeados (Hubert y Hentze, 2002).

Con respecto a la regulación transcripcional de las isoformas, los tipos celulares que poseen la isoforma 1A son particularmente sensibles a los niveles de hierro, mientras que aquellos que poseen el exón 1B no responden significativamente a la

concentración de hierro (Hubert y Hentze, 2002; Núñez, 2010). De la misma forma, el mensajero de las isoformas +IRE es más sensible a la concentración de hierro que la isoforma -IRE, consistente con la presencia de un elemento “IRE” (iron responsive element) en la región no traducida de esta isoforma. De esta manera, la isoforma 1A/+IRE le confiere a las células que lo expresan la más alta sensibilidad a la concentración de hierro (Hubert y Hentze, 2002; Núñez, 2010). Interesantemente, en células del epitelio intestinal se ha mostrado la expresión de estas cuatro isoformas (Hubert y Hentze, 2002).

Otra modificación que le confiere distintas propiedades de tráfico a las isoformas es la glicosilación de DMT1, pues ha sido demostrado que en células epiteliales polarizadas MDCK esta modificación parece ser una señal de destinación al dominio apical (Tabuchi y cols., 2002). En efecto, la localización de DMT1 en células epiteliales polarizadas intestinales es principalmente apical, consistente con su rol en la incorporación de hierro desde el lumen del intestino (Canonne-Hergaux y cols., 1999), aunque las inmunofluorecencias para DMT1 han mostrado también marca citosólica y basolateral (Yeh y cols., 2000; Núñez y cols., 2010).

Se ha demostrado que en la línea celular de carcinoma de laringe humana Hep-2 y en células MDCK la isoforma +IRE de DMT1 trafica entre el dominio apical y el lisosoma, en contraste con la isoforma -IRE que se encuentra conectada funcionalmente al receptor de transferrina y trafica desde la superficie basolateral hacia los endosomas de reciclaje donde se postula que participa en la salida de hierro desde estos compartimentos (Tabuchi y cols., 2002). Para esta isoforma se ha establecido que su

endocitosis depende de clatrina y de dinamina (Touret y cols., 2003). Sobre la endocitosis de la isoforma +IRE sólo se sabe que en estado basal (sin variaciones en el hierro externo) no depende de clatrina ni de dinamina (Lam-Yuk-Tseung y Gros, 2006).

En células LLC-PK1 de túbulos proximales de riñón de cerdo, se ha demostrado que en estado basal, ambas isoformas tienen diferencias en sus velocidades de internalización y de abundancia en la membrana. En este tipo celular, la isoforma +IRE de DMT1 es internalizada con cinéticas menores desde la superficie celular comparada con la isoforma -IRE, lo que resulta en una proporción aumentada de esta isoforma en la membrana plasmática (Lam-Yuk-Tseung y Gros, 2006).

En el intestino, se ha reportado que la proteína madura de DMT1 sufre cambios notables en cuanto a su localización en respuesta a la oferta de hierro y en ausencia de cualquier otra señal sistémica (Ma y cols., 2006; Núñez y cols., 2010), (Figura 1).

Se ha propuesto que la oferta de hierro induce en DMT1 un proceso endocítico que lo lleva a co-localizar con apotransferrina endocitada basolateralmente, definiendo el transporte vesicular de hierro (Ma y cols., 2002; Moriya y Linder, 2006). En este caso, la relocalización mencionada de DMT1 sería necesaria para el normal transporte de hierro y DMT1 estaría continuamente ciclando entre la superficie celular y un compartimiento endosomal basolateral (Ma y cols., 2002), mediando el paso de hierro transepitelial.

En contraste, otros autores han postulado que esta relocalización de DMT1 en respuesta al hierro podría ser un mecanismo regulatorio que le permitiría al intestino frenar la entrada de hierro ante una oferta excesiva del metal, redistribuyendo

rápida mente la proteína sin afectar los niveles de proteína total, mucho antes que se efectúe la regulación transcripcional que ha sido descrita para la isoforma +IRE y que ocurre en escalas de tiempo mayores (Johnson DM y cols., 2005; Núñez, 2010; Núñez y cols., 2010).

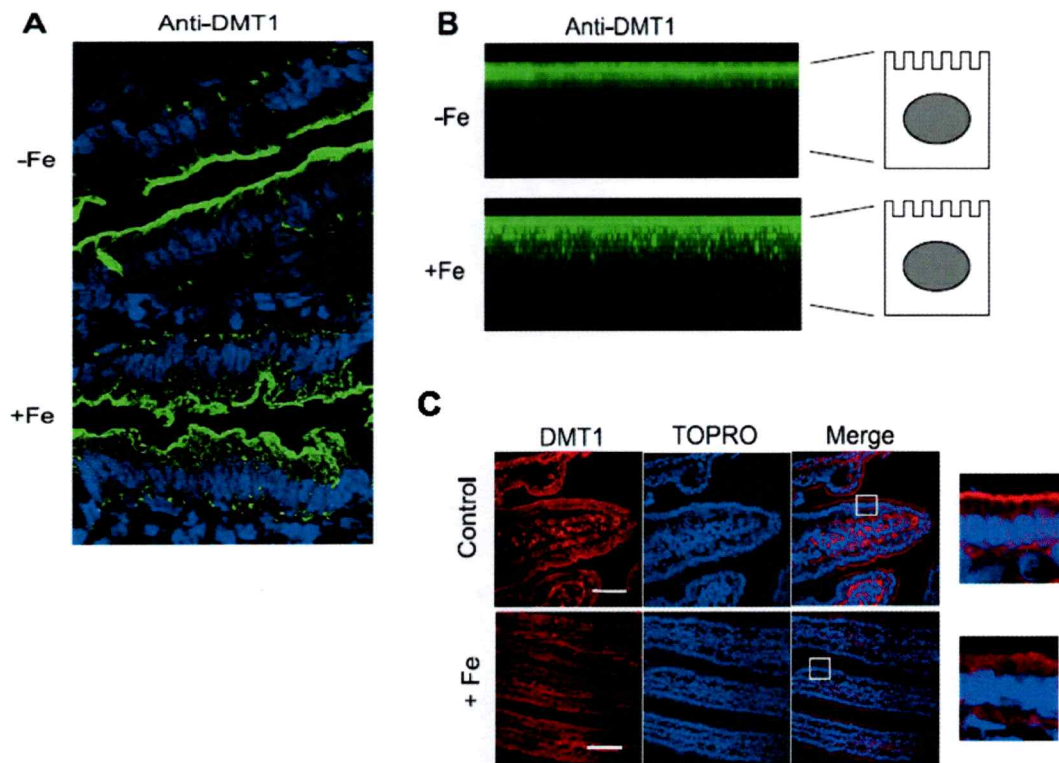


Figura 1. La oferta de hierro induce cambios notables en la distribución de DMT1. (A) DMT1 (verde) en epitelio intestinal de rata en condiciones de ayuno (-Fe) y 20 minutos tras la administración de un bolo de hierro (+Fe) (dosis de pellet, 250 mg, que contuvo una cantidad definida de hierro como FeSO_4 a una dosis de 50 μg Fe/g peso corporal). (B) DMT1 (verde) en células Caco-2 preincubadas en medio bajo en hierro (-Fe) y 10 minutos tras la aplicación de hierro 1 μM (ascorbato ferroso 1 μM). La monocapa de células Caco-2 fue disectada óptimamente cada 2 μm para dar 12 cortes por cada campo. (C) DMT1 (rojo) en epitelio de rata en condiciones de ayuno (control) y 2,5 hrs tras la aplicación de una dosis de hierro (+Fe) (inyección intragástrica, FeSO_4 20 mg en 250 μL HCl 0,01 N, preparado inmediatamente antes de la administración; la solución contuvo ácido ascórbico 5 M) La barra de escala representa 60 μm . (A) y (B) tomadas de Ma y cols., 2006. (C) tomada de Núñez y cols., 2010.

Este fenómeno de relocalización de DMT1 en respuesta al hierro entendido como una respuesta regulatoria podría explicar el fenómeno de bloqueo mucosal (Hahn y cols., 1943; Stewart y cols., 1950; Frazer y cols., 2003). El bloqueo mucosal describe la capacidad del epitelio intestinal de hacerse refractario a la absorción de hierro tras haber recibido una dosis elevada. Esta respuesta es extremadamente rápida estableciéndose en un lapso temporal de 1 a 2 horas. En esta propuesta, DMT1 podría relocalizarse de tal forma que promoviera además del bloqueo en la absorción, una respuesta de reversión de la carga de hierro (Núñez y cols., 2010; Núñez, 2010). Pues en efecto, la eventual relocalización de DMT1 al dominio basolateral podría incrementar la incorporación basolateral de hierro (Núñez y cols., 2010).

Todo este proceso de endocitosis y relocalización de DMT1 en respuesta al hierro se da en escalas de tiempo de 30 a 60 minutos (Ma y cols., 2006; Núñez, 2010), consistente con el tiempo que demora el bloqueo mucosal, tiempo en el cual, una oferta de hierro 100 μM a células Caco-2 del epitelio intestinal ha mostrado no variar los niveles de mensajero, los que se mantienen estables durante al menos 4 horas, variando significativamente sólo tras 24 horas de tratamiento (Johnson DM y cols., 2005). Además, este proceso se efectúa en ausencia de síntesis denovo de DMT1, pues se ha mostrado que ocurre igualmente en presencia de cicloheximida y que el nivel de proteína total de DMT1 en estas condiciones no varía significativamente durante al menos 24 horas (Johnson DM y cols., 2005).

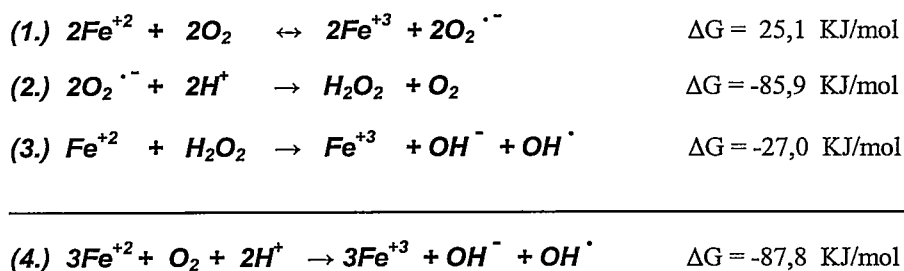
En resumen, según los datos disponibles en la actualidad, la oferta de hierro induce un movimiento endocítico de DMT1 hacia compartimentos internos, pero no está

demostrado claramente que esta respuesta permita el transporte normal de hierro transepitelial o sea una respuesta regulatoria que contemple su enriquecimiento en las membranas basolaterales, su secuestro intracelular o su eventual degradación. De igual forma, no se conocen los factores o intermediarios moleculares que le permiten al hierro gatillar esta endocitosis rápida de DMT1. Sin embargo, esta respuesta parece ser específica para la isoforma DMT1+IRE, pues ha sido reportado que no ocurre con la isoforma DMT1-IRE (Johnson DM y cols., 2005).

Hierro y la producción de ROS

Como se ha mencionado el hierro, en su estado de oxidación +2, es un productor de ROS como se ejemplifica en la reacciones de Haber-Weiss y Fenton. Según estas reacciones, con la presencia de hierro y oxígeno se generan superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (Valko y cols., 2005).

Reacciones de Haber-Weiss / Fenton



Las reacciones 1-3 se conocen como Haber-Weiss; la reacción 3 se conoce como Fenton

Este set de reacciones describe que el Fe^{2+} en presencia de oxígeno cataliza la producción de superóxido (1.), el que rápidamente autodismuta a peróxido de hidrógeno (2.). El peróxido de hidrógeno en presencia de más Fe^{2+} genera el altamente reactivo

radical hidroxilo (3.). Este fenómeno ocurre intracelularmente y en el medio de cultivo. Mientras exista oxígeno y el hierro este libre de la unión a proteínas, estará continuamente alternando entre sus estados de oxidación y el ciclo continuará produciendo especies reactivas (Breuer y cols., 2008). Esta producción de ROS se favorece en el exterior celular por la abundante presencia de oxígeno en el medio de cultivo e intracelularmente dado el ambiente reductor celular y la presencia de ferrireductasas que permiten que el hierro ingresado alterne activamente entre sus estados di y tri-valentes (Breuer y cols., 2008)

ROS como posibles mediadores del proceso de relocalización de DMT1 en respuesta a hierro.

Debido a que el hierro cataliza la producción de especies reactivas del oxígeno, una interesante posibilidad es que las ROS producidas en presencia de hierro puedan ser una señal de internalización de DMT1. En efecto, el hierro entrante podría modificar rápidamente el tono redox celular, favoreciendo la modificación de proteínas sensibles a modificaciones oxidativas, entre éstos, el propio DMT1 o las proteínas accesorias responsables de su endocitosis.

Otra posibilidad es que especies reactivas del oxígeno extracelulares puedan modificar la membrana plasmática, permitiendo o induciendo la internalización de DMT1.

En este trabajo nos propusimos estudiar el papel del tono oxidativo intra y extracelular inducido por hierro en el tráfico y la relocalización temprana que

experimenta DMT1 en respuesta a la oferta de hierro. Como modelo de absorción intestinal, utilizamos la línea celular humana Caco-2 crecidas en insertos bicamerales, donde estas células alcanzan un fenotipo completamente polarizado de epitelio intestinal. Los insertos bicamerales permiten además el acceso diferencial a las membranas apicales y basolaterales y representan un modelo simplificado del proceso de absorción intestinal de hierro (Figura 2).

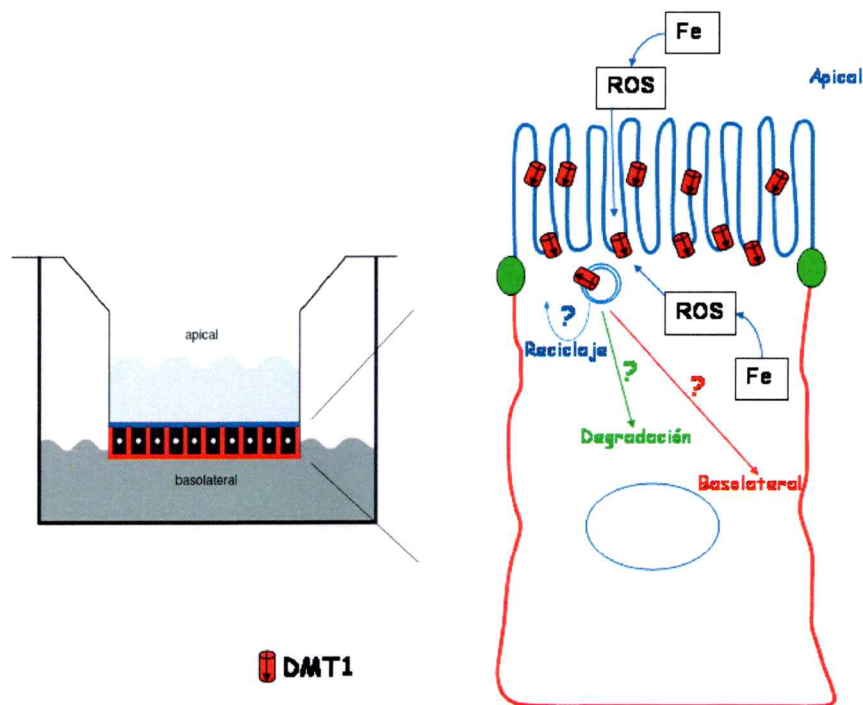


Figura 2. Modelo de estudio. Células Caco-2 crecidas en insertos bicamerales en un sistema simplificado de absorción intestinal de hierro. El modelo postula que la endocitosis o internalización del transportador de hierro DMT1 inducido por hierro, podría involucrar las especies reactivas del oxígeno (ROS) producidas por la oferta de hierro. Debido a que la oferta de hierro genera en este sistema especies reactivas extracelulares e intracelulares, consideramos que la naturaleza de esta señal oxidativa podría ser extra o intracelular. Una vez internalizado, DMT1 podría ser destinado de vuelta a la membrana apical (reciclaje), destinado a degradación, o a la membrana basolateral.

HIPÓTESIS

“Hierro induce la endocitosis del transportador DMT1+IRE mediante la producción de especies reactivas del oxígeno”.

OBJETIVOS

a. Objetivo general:

Investigar si la endocitosis de DMT1+IRE inducida por hierro requiere la producción de especies reactivas del oxígeno.

b. Objetivos específicos:

1. Determinar la cinética de internalización de DMT1+IRE en las membranas apicales a lo largo del tiempo, en condiciones basales y tras la aplicación de hierro apical.
2. Determinar en células Caco-2 la producción de ROS tras la adición de hierro.
3. Investigar si el tratamiento con antioxidantes y atrapadores de especies reactivas del oxígeno puede bloquear la respuesta de internalización de DMT1+IRE en respuesta a hierro.
4. Investigar si la producción de ROS en ausencia de hierro puede recrear la endocitosis de DMT1+IRE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos generales. acrilamida, ácido ascórbico, persulfato de amonio, azul de bromofenol, 2-mercaptoetanol, bis-acrilamida, BSA, CaCl₂, deoxicolato de sodio, EDTA, etanol, FeCl₃, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, glicina, glicerol, glucosa, HEPES, HCl, KCl, KH₂PO₄, MgCl₂, MgSO₄, metanol, NaCl, Na₂HPO₄, NaHCO₃, NaOH, NP40, NTA, NH₄Cl, PMSF, rojo ponceau, SDS, TEMED, TRIS y Tween20.

Equipos utilizados. Campana de Flujo Laminar Horizontal, NuAire; Campana de Flujo Laminar Vertical MSC9, Jouan; Incubador HEPA Class 100, Thermo Electron Corporation; Microcentrífuga MIKRO 22R, Hettich; Multímetro Millicell® ERS-2, Millipore; Lector de Placas Sunrise™, Tecan; Sistema para Geles Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell, Bio-Rad; Sistema de Transferencia Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad; Lector de Fluorescencia Synergy 2™, BioTek.

Sondas fluorescentes. 2',7'-diclorodihidro fluoresceína-diacetato (DCDHF-AM) y calceína-AM (Invitrogen, Molecular Probes).

Cultivo celular. Células Caco-2 (CRL-2102, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) crecidas en insertos bicamerales. Estas células se diferencian a un fenotipo de intestino delgado fetal formando monocapas celulares con uniones estrechas. Las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco®, Life Technologies), suplementado con NaHCO₃ 3,7 g/L, esterilizado mediante

filtros de 0,22 μm (TPP, Techno Plastic Products AG) y complementado con solución de antibiótico y antimicótico (Anti-Anti, Gibco®, Invitrogen) y suero fetal de bovino (SFB) 10 % (Gibco®, Invitrogen). Para la mantención de las células se sembraron en placas de 60 mm (P60, Corning) a una densidad de 150.000 células/placa y fueron cultivadas durante 7 días, con cambio de medio día por medio. Para los cambios de medio las células se lavaron 2 veces con amortiguador fosfato salino modificado por Dulbecco (PBS) (Gibco®, Invitrogen). Para los pasajes de las células se utilizó tripsina (0,5 % Trypsin-EDTA, Gibco®, Invitrogen). Para los experimentos de biotilación, las células fueron sembradas a una densidad de 100.000 células/inserto en insertos bicamerales de 30 mm de diámetro con un poro de 0,4 μm (Millicell® Cell Culture Inserts, Millipore) durante 20-21 días, con cambio de medio día por medio. Durante todo este período se monitoreó su resistencia transepitelial, mediante un multímetro (Millicell® ERS-2, Epithelial Volt-Ohm-Meter, Millipore), se consideró que la monocapa de células estaba intacta cuando los insertos registraron una resistencia mayor a 250 $\text{ohm}\times\text{cm}^2$ (Álvarez-Hernández y cols., 1991). Para los registros de fluorescencia, las células se sembraron en placas de 24 pocillos (Corning-Costar) a una densidad de 15.000 células/pocillo y se cultivaron durante 7-8 días, con cambio de medio día por medio. Las células fueron sembradas en placas de 6 insertos para las biotilaciones, cada una de estas placas se utilizó para obtener una réplica biológica de los experimentos respectivos. En el caso de los registros de fluorescencia, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos, lo que permitió hacer determinaciones en duplicado para cada concentración de hierro ocupada.

Preparación de las soluciones de Fe⁺² y Fe⁺³. Se ofreció a las células 3 fuentes de hierro. Se probaron dos fuentes de Fe⁺² que consistieron en sulfato de amonio ferroso, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ (FAS), y otra solución de ascorbato ferroso (Fe:Asc). La solución de FAS es la más parecida a la oferta de hierro que tienen las células del epitelio intestinal *in vivo*, pero precipita rápidamente en solución por lo que se preparó fresca para cada experimento y las incubaciones no fueron por más de 90 minutos, para asegurar que la menor cantidad de precipitación ocurriese. Se preparó una solución stock de FAS 5 mM, disuelta en dH₂O. La otra fuente de Fe⁺² fue una mezcla de FeCl₃ y ascorbato (1:20, mol:mol) (Fe:Asc). Para preparar esta solución se mezcló una solución de FeCl₃ 100 mM (disuelta en HCl 1 N) con otra solución de ascorbato 1 M para permitir que el hierro se mantuviera en solución en su estado de oxidación +2. Se preparó una solución stock Fe:Asc 3 mM.

Se probó también una fuente de Fe⁺³, como Fe:NTA. Esta solución se preparó mezclando una solución stock de FeCl₃ 100 mM (disuelta en HCl 1 N) con NTA 100 mM (ácido nitrilotriacético, Sigma-Aldrich) en una relación Fe:NTA de (1: 2,2, mol:mol), preparándose una solución stock Fe:NTA 5 mM. El NTA permitió que el hierro permaneciera en forma estable en su estado de oxidación +3 en solución.

Agentes que afectan el tono redox usadas en las preincubaciones: NAC (N-acetil-L-cisteína, Sigma-Aldrich); DMSO (dimetil sulfóxido, Merck); SOD (superóxido dismutasa, Sigma-Aldrich); CAT (catalasa, Sigma-Aldrich), y H₂O₂ (peróxido de hidrógeno 30 %, Perhydrol®, Merck). En todos los experimentos realizados, las células

Caco-2 fueron incubadas durante la noche en DMEM 2 % SFB como una forma de disminuir el LIP, previo a la oferta con hierro. El SFB contiene el hierro necesario para el cultivo celular. Por lo tanto, al disminuir la concentración del SFB se disminuye la cantidad disponible de hierro. Todas las preincubaciones fueron realizadas en DMEM sin suero.

Los tiempos de incubación fueron los siguientes: NAC 5 mM durante 1 hora 30 minutos; DMSO 0,4 % V/V durante 30 minutos; SOD y catalasa 100 U/mL durante 1 hora.

Biotinilación selectiva de proteínas de superficie. Una vez aplicados los tratamientos a las células (incubación con diversas ofertas de hierro por diversos tiempos y en presencia o ausencia de bloqueadores y los otros agentes empleados) se procedió a biotinilar las proteínas de la membrana apical para cuantificar la presencia o ausencia de DMT1+IRE. Con la placa en hielo, las células se lavaron 3 veces con PBS-CaMg frío (PBS suplementado con $MgCl_2$ 1 mM y $CaCl_2$ 1,3 mM). Para biotinilar las placas de insertos se incubaron con 500 μ L de una solución de biotina 0,5 mg/mL en PBS-CaMg (EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce, Thermo Scientific) en la cámara apical, y se compensó con 1 mL de PBS-CaMg en la cámara basolateral. Se incubó por 30 minutos en hielo con agitación suave para permitir la conjugación de las proteínas con la biotina. Terminada esta incubación, se eliminó la biotina, y se lavaron las células con NH_4Cl 50 mM en PBS-CaMg frío para neutralizar la biotina libre que no se conjugó

a las proteínas de superficie. Además se lavaron las células dos veces con PBS-CaMg. Terminados los lavados se procedió a preparar los extractos celulares.

Preparación de extractos celulares. Una vez aplicado a las células el tratamiento respectivo y biotiniladas las proteínas de la membrana apical, se preparó un extracto estándar de proteínas mediante la incubación de las células con amortiguador de lisis RIPA, pH 7,5: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP-40 1 %, SDS 0,1 %, deoxicolato de sodio 0,5 % y PMSF 1 mM (fenilmetilsulfonil fluoruro, Sigma-Aldrich). El amortiguador se suplementó con un cocktail de inhibidores de proteasas (Complete®, Mini EDTA-free, Roche). Los insertos se agitaron a 4 °C durante 1 hora, tras lo cual se desprendieron la totalidad de las células usando un scraper y se colectó el extracto en tubos eppendorfs de 1,5 mL. Para asegurar la solubilización total de las proteínas de membrana se agitó vigorosamente (vortex) durante 2 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm (14.160 RCF) durante 15 minutos. El sobrenadante se usó para la determinación de la concentración de proteínas y para la posterior precipitación con streptoavidina unida a esferas de agarosa.

Determinación de la concentración de proteínas. Para la determinación de la concentración de proteínas en los extractos celulares se ocupó el método del BCA (Bicinchoninic Acid™, Pierce, Thermo Scientific), una derivación del método Lowry para determinar concentración de proteínas, que genera un complejo coloreado con Cu^{+2} . Como estándar se ocupó una solución stock de BSA (albúmina de suero bovino

disuelta en dH₂O) a una concentración de 1 mg/mL. El método desarrolla un color que varía desde el verde hacia el morado y se determinó la absorbancia a 562 nm en un lector de placas Sunrise™ (Tecan). Para cada determinación de la concentración de proteínas se construyó una curva de calibración con cantidades conocidas de BSA y se determinó la concentración de proteínas de las muestras a partir de dicha curva de calibración. Se calculó el volumen necesario para obtener 100 µg de proteínas totales.

Preparación de streptoavidina unida a esferas de agarosa y precipitación.

En experimentos previos en nuestro laboratorio se estableció el volumen necesario de esferas que permite precipitar la totalidad de las proteínas conjugadas a biotina presentes en 100 µg de extracto total. Se precipitaron 100 µg de proteínas totales con 30 µL de la solución stock al 50 % de streptoavidina unida a esferas de agarosa (Streptavidin Agarose Resin®, Pierce, Thermo Scientific). En un experimento típico se analizaron 6 insertos. Para la precipitación de 6 muestras se tomaron 200 µL de la solución stock de esferas y se lavaron durante 1 hora a 4 °C con 600 µL de amortiguador de lisis RIPA para permitir su hidratación total y aclimatación al medio de precipitación. Para rescatar las esferas se centrifugaron durante 1 minuto a 1.300 rpm (3.910 RCF). El sobrenadante se descartó, dejando 200 µL originales y se agregó 100 µL de dH₂O y 50 µL de SDS 10 %. Los 350 µL finales se separaron en 6 tubos eppendorfs, y posteriormente se le agregó el volumen necesario de streptoavidina-agarosa para precipitar cuantitativamente las proteínas biotiniladas como descrito más arriba. Por lo tanto, cada tubo contuvo la misma cantidad de streptoavidina unida a esferas de agarosa

y la misma cantidad de proteínas totales. La precipitación se llevó a cabo durante la noche a 4 °C con agitación suave.

Preparación de las muestras precipitadas. Se realizó según metodología descrita (Arredondo y cols., 2006). Tras la incubación durante la noche con streptoavidina unida a agarosa, la solución de precipitación se centrifugó a 1.300 rpm (3.910 RCF) durante 1 minuto y el sobrenadante se descartó. Posteriormente las proteínas biotiniladas unidas a las esferas de agarosa se lavaron secuencialmente con las soluciones denominadas TPII, TPIII y TPIV. Después de cada lavado, las esferas se rescataron centrifugándolas a 1.300 rpm (3.910 RCF) durante 1 minuto. Estas soluciones fueron: TPII: Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, BSA 0,2 % y SDS 0,1 %; TPIII: Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y BSA 0,2 %; TPIV: Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Tras el lavado con TPIV las esferas se dejaron lo más secas posible y se resuspendieron en 30 µL de amortiguador de carga 5X (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glicerol 25 %, SDS 2 %, 2-mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1 %). Esta solución con las proteínas precipitadas se calentó a 100 °C durante 5 minutos para separar las proteínas de las esferas. La totalidad de esta solución se cargó en un gel de poliacrilamida.

Geles de poliacrilamida y transferencia a membranas de nitrocelulosa. Se prepararon geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones desnaturantes. Los geles se prepararon utilizando el sistema Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Se

cargó un carril con un estándar de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein (Fermentas). Para la corrida del gel se usó un amortiguador preparado fresco con Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1 %. Los geles se corrieron a 80 mV durante 30 minutos hasta que la carga pasó al gel separador. Posteriormente se subió el voltaje a 100 mV y se continuó corriendo durante 90 minutos hasta que el frente salió del gel. El tiempo total de corrida fue de 2 horas.

Para la transferencia se utilizó el sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (PROTRAN®, Whatman®, PerkinElmer™) utilizando un amortiguador de transferencia con Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 % y SDS 0,01 %, el que se preparó fresco y se enfrió previamente en hielo. La transferencia se montó y se efectuó a 4 °C y a 300 mA, corriente constante durante 90 minutos.

Anticuerpos. En esta tesis se utilizó un anticuerpo policlonal producido en conejo anti-DMT1 isoforma +IRE, producido por encargo a Bio-Synthesis (Bio-Synthesis Inc., Lewisville, Texas). El péptido antigénico fue: GCSKVLLSEETTRGY, que es una secuencia consenso para ratón, rata y humano, correspondiente a un segmento proteico en el carboxilo-terminal de DMT1 +IRE. Los aminoácidos que reconoce el anticuerpo están destacados con asteriscos (*) en la Figura 13. Se utilizó también un anticuerpo anti-ferroportina, monoclonal producido en ratón, con la secuencia CGPDEKEVTKENQPNTSVV (Centro de Servicios de Inmunología, Facultad de Ciencias, U. de Chile). Se utilizaron los anticuerpos secundarios anti-IgG de

conejo, acoplado a peroxidasa (ImmunoPure® Antibody, Pierce, Thermo Scientific) y anti-IgG de ratón, acoplado a peroxidasa (ImmunoPure® Antibody, Pierce, Thermo Scientific)

Inmunodetección. Terminada la transferencia se comprobó el éxito de ésta tñiendo la membrana con rojo ponceau. Esta tñición es reversible y no afectó la inmunodetección. Se incubó durante unos minutos y se lavó con dH₂O, se destñó completamente con TBS-T20, pH 7,5: Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM y Tween20 0,1 %.

Para la inmunodetección de DMT1+IRE se usó el siguiente protocolo: bloqueo en leche descremada al 5 % preparada en TBS-T20. El bloqueo se efectuó durante la noche a 4 °C. Posteriormente se lavó una vez con TBS-T20 y se incubó con el anticuerpo primario consistente en una solución de leche al 1 % en TBS-T20 usando el anticuerpo DMT1+IRE a una concentración de 1:1.000. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las membranas 3 veces con 30 mL de TBS-T20 durante 15 minutos cada vez. Luego se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario consistente en una solución de leche al 1 % en TBS-T20 usando el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo a una concentración de 1:10.000. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las membranas 3 veces con 30 mL de TBS-T20 durante 15 minutos cada vez y se revelaron las membranas usando el kit SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce, Thermo Scientific).

Para la inmunodetección de ferroportina se usó el mismo protocolo. La concentración de anticuerpo anti-ferroportina fue de 1:500. Para este anticuerpo se usó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón a una concentración de 1:5.000.

Determinación de la entrada de hierro y producción de ROS intracelulares.

Se utilizaron las sondas calceína-AM que permite seguir la entrada de hierro (San Martín y cols., 2008) y la sonda DCDHF-DA, para determinar la producción de ROS (Núñez y cols., 2004). En estos experimentos, las células Caco-2 fueron sembradas en placas de 24 pocillos y crecidas durante 7-8 días en DMEM 10 % SFB. El día previo al experimento se cambió el medio de mantención por DMEM 2 % SFB y fueron incubadas durante la noche, para disminuir la disponibilidad de hierro y disminuir el LIP. Para las preincubaciones se usó DMEM sin suero. Previo a la carga de los fluoróforos se lavaron 3 veces con DMEM sin suero y sin rojo fenol (Sigma-Aldrich). La carga de los fluoróforos se realizó en DMEM sin suero y sin rojo fenol. La concentración y los tiempos de carga para cada fluoróforo fueron los siguientes: para la calceína-AM se utilizó una concentración de 1 μ M durante 15 minutos y para la DHDCF-DA se utilizó una concentración de 10 μ M durante 10 minutos. Las soluciones con los fluoróforos y la placa con las células durante y tras la carga fueron mantenidas en la oscuridad. Después de la carga, las células fueron lavadas dos veces con DMEM sin suero y sin rojo fenol y una vez con amortiguador fisiológico HBSS, pH 7,4: NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0,5 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, MgSO₄ 0,4 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, HEPES 25 mM y glucosa 5 mM. Para el registro de fluorescencia las

células fueron incubadas en HBSS, 300 μ L por pocillo, y se les permitió a las células un tiempo de recuperación de 5 minutos a 37 °C en el incubador, previo a la obtención de los registros. Para los lavados e incubaciones se usaron soluciones precalentadas a 37 °C y los registros fueron obtenidos también a 37 °C, en un lector de fluorescencia Synergy 2™ (BioTek), usando para ambas sondas las longitudes de onda de excitación y emisión, Ex/Em, 485/528. Para la obtención de los registros se midió la fluorescencia durante 5 minutos para obtener la línea base, tras lo cual se ofreció a las células diversas concentraciones de FAS. Para la presentación de los datos, se dividió cada dato de fluorescencia obtenido (F) por la fluorescencia inicial registrada (F0), obteniéndose para cada punto en el tiempo un valor de F/F0.

Programas utilizados. Para realizar la construcción de todos los gráficos se utilizó el programa GraphPad Prism 5. Este programa fue ocupado además para realizar las regresiones lineales y regresiones no lineales.

Para realizar las densitometrías de las réplicas en los experimentos del efecto de NAC, DMSO, SOD, catalasa y peróxido de hidrógeno se ocupó el programa ImageJ.

Análisis estadístico. Se realizó mediante el programa GraphPad InStat, utilizando un test ANOVA (Análisis de Varianza) de una vía (el parámetro a comparar fue la abundancia de DMT1+IRE en la membrana apical).

RESULTADOS

1. Determinación de la cinética de internalización de DMT1+IRE en las membranas apicales a lo largo del tiempo, en condiciones basales y tras la aplicación de hierro apical.

Mediante la biotinylación selectiva de la membrana apical y posterior precipitación usando streptoavidina unida a esferas de agarosa se siguió la endocitosis de DMT1+IRE que desencadena la oferta de hierro. A través de esta técnica sumamente sensible, se siguió por un período de 90 minutos la presencia y desaparición de DMT1+IRE desde el dominio apical de células Caco-2 en tiempos crecientes desde la aplicación del hierro apical.

Para la construcción de estas cinéticas se investigó el efecto del hierro utilizando 3 formas de Fe en el medio apical a una concentración de 20 μ M (Figura 3A). Las tres ofertas de hierro provocaron una disminución de DMT1+IRE en la membrana apical y una posterior recuperación tal como ha sido descrito (Ma y cols., 2006). Este efecto de inducción de la endocitosis y posterior retorno a la membrana de DMT1+IRE fue observado para las tres ofertas de hierro. En claro contraste, la presencia de ferroportina en la membrana apical en estas mismas condiciones no mostró variación de abundancia en el tiempo (Figura 1C). Estos cambios de abundancia de DMT1+IRE en la membrana apical fueron provocados por la oferta de hierro, pues comprobamos que no se efectuó en condiciones basales en ausencia de hierro (Figura 3B)

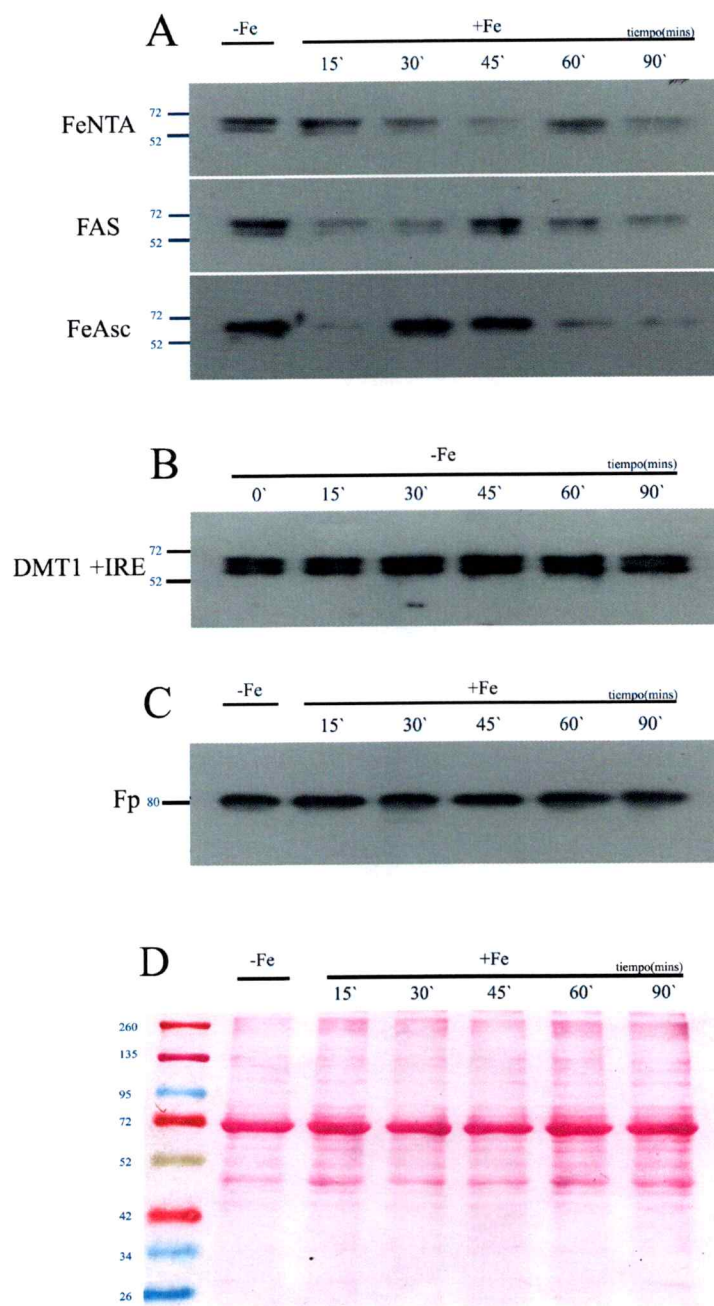


Figura 3. Cinética de internalización de DMT1+IRE inducida por la oferta de hierro. (A) DMT1+IRE detectado por biotinilación de la membrana apical a tiempo cero y en diversos tiempos tras la aplicación de Fe:NTA (Fe^{+3}), FAS (Fe^{+2}) y Fe:Asc (Fe^{+2}) 20 μM . **(B)** Inmunodetección de DMT1+IRE detectado por biotinilación de la membrana apical, en ausencia de hierro. **(C)** Inmunodetección de ferroportina (Fp) detectada por biotinilación de la membrana apical, en ausencia y tras la aplicación de FAS 20 μM . **(D)** Tinción con rojo ponceau de los extractos apicales biotinilados en ausencia y tras la aplicación de FAS 20 μM , mostrando el típico bandeo de las muestras tras la precipitación con streptoavidina unida a esferas de agarosa.

Para tener una estimación de la carga al gel en los experimentos de biotilación, teñimos la membrana de nitrocelulosa con rojo ponceau (Figura 3C). La tinción mostró que la cantidad de proteínas precipitadas totales fue relativamente constante. Por lo tanto, la disminución que observamos en DMT1+IRE no se debe a que exista variación en la carga del gel.

De las tres ofertas de hierro, la que provocó un efecto más pronunciado fue la oferta con Fe:Asc 20 μM (Fe^{+2}), provocando una disminución de DMT1+IRE desde la membrana apical tras 15 minutos de incubación. Sin embargo, a los 30 y 45 minutos tras esta oferta de hierro la marca para DMT1+IRE aumentó, volviendo a disminuir a los 60 minutos y manteniéndose baja tras 90 minutos de incubación. Por otro lado, la oferta que tuvo un efecto más lento en cuanto a la internalización inicial de DMT1 fue la oferta con Fe:NTA 20 μM (Fe^{+3}), verificándose la primera disminución recién a los 45 minutos. Tras 60 minutos de incubación con hierro, DMT1+IRE volvió a encontrarse elevado en la membrana y disminuyó nuevamente tras 90 minutos. Esta cinética retardada puede ser explicada considerando que la oferta de hierro disponible para transporte a partir de Fe:NTA debe ser menor, debido al efecto secuestrador del quelante y a la necesaria reducción a Fe^{+2} previo al transporte por DMT1. Finalmente, un efecto intermedio entre los dos descritos se obtuvo con la oferta con FAS 20 μM (Fe^{+2}), verificándose la primera desaparición tras 15 minutos de incubación con hierro, la que se mantuvo hasta los 30 minutos. A los 45 minutos la cantidad de DMT1+IRE en la membrana apical aumentó, volviendo a disminuir tras 60 y 90 minutos de incubación.

Para las tres ofertas de hierro se produjo una disminución con respecto a la marca control tras 90 minutos de incubación con Fe.

La oferta con FAS es la más parecida a la oferta fisiológica de hierro in vivo, por lo que se usó para todos los experimentos que se describen más adelante en esta tesis. Adicionalmente, decidimos descartar Fe:NTA y Fe:Asc como formas de oferta de hierro considerando que el NTA disminuye la oferta de hierro transportable en tanto que, por su capacidad reductora, el ascorbato podría interferir en el tono redox celular. Además, ha sido demostrado que la oferta de ascorbato provoca per se un efecto en la expresión de DMT1, ferritina y Dcytb en células Caco-2 (Scheers y Sandberg, 2008), lo que podría dificultar nuestras futuras conclusiones. De esta forma, decidimos investigar qué factor o factores asociados a la adición de hierro inducen la endocitosis de DMT1+IRE que se observa a los 15 minutos tras la aplicación de FAS como oferta de hierro fisiológico.

En estos experimentos, el anticuerpo anti-DMT1+IRE que fue utilizado siempre arrojó la presencia de dos bandas que migraron entre los estándares de peso moleculares 72 y 52 KDa. Cuando corrimos nuestras muestras con otro marcador de peso molecular, el doblete migró a la misma altura del marcador de 64 kDa (Figura 8A). Creemos que este doblete identifica la isoforma 1A que es mayoritariamente expresada en este tipo celular (Hubert y Hentze, 2002) y podría indicar la presencia de las variantes glicosiladas y no glicosiladas de la isoforma 1A/+IRE (Tabuchi y cols., 2002). Para la cuantificación en las densitometrías de los experimentos posteriores siempre se consideraron ambas bandas.

2. Determinación en células Caco-2 de la producción de ROS tras la adición de hierro.

Se verificó el ingreso del hierro al pool de hierro citosólico, mediante la sonda calceína-AM. Calceína-AM es una molécula permeable no fluorescente que emite fluorescencia tras ser clivada intracelularmente a calceína mediante esterasas citoplasmáticas. La señal fluorescente de esta sonda experimenta un apagamiento al unir metales como el hierro.

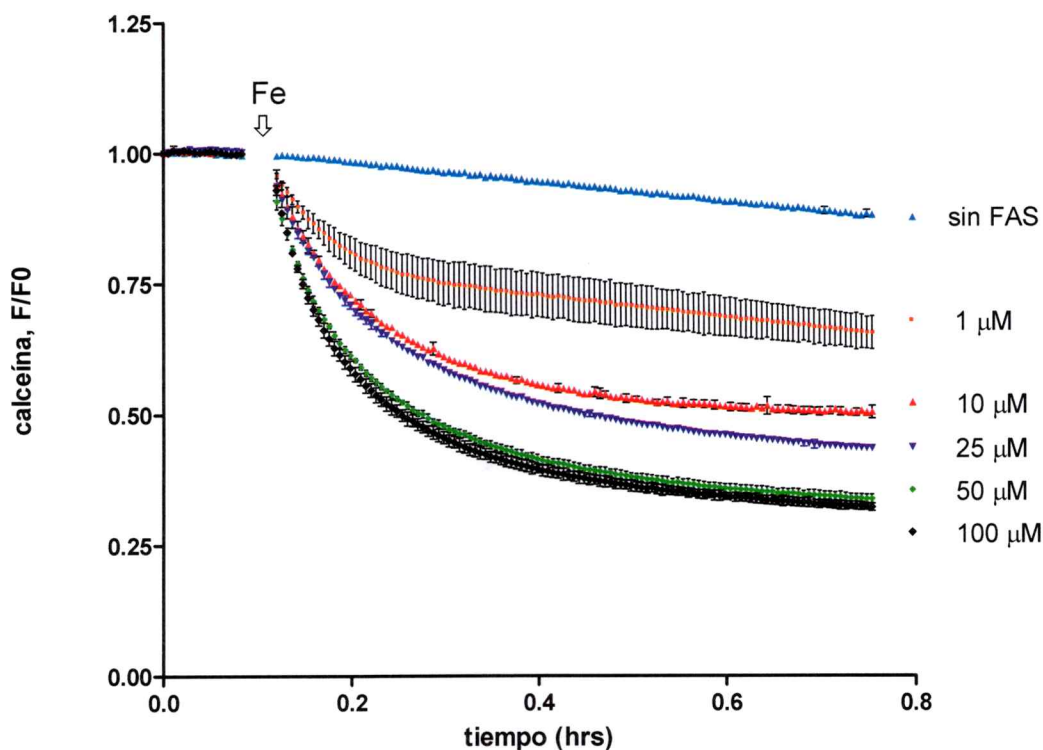


Figura 4. Entrada de hierro a células Caco-2. Registros de apagamiento en la fluorescencia de calceína inducida por diversas concentraciones de FAS. Se registró una línea base durante 5 minutos, tras lo cual se aplicó la cantidad de hierro correspondiente. Cada valor de fluorescencia está dividido por la fluorescencia inicial registrada, F/F0. Los valores corresponden a la media \pm la desviación estándar de dos determinaciones.

La oferta de FAS indujo un rápido decaimiento de la fluorescencia de calceína desde concentraciones FAS 1 μM , en una cinética que se diferenció claramente de la fluorescencia registrada en ausencia de hierro y que representa el apagamiento espontáneo de la sonda en el tiempo (trazo azul, Figura 4). La oferta con FAS 10 μM provocó que la fluorescencia bajara a la mitad de la fluorescencia inicial tras 45 minutos de registro, siendo sólo ligeramente diferente a la disminución provocada por FAS 25 μM . De una forma similar, una oferta de FAS 50 μM provocó casi la misma caída en la fluorescencia que una oferta de FAS 100 μM , lo que es un claro indicio que en estas concentraciones la capacidad de transporte de hierro al interior celular ha alcanzado su máximo y el transporte se encuentra saturado. Para cuantificar este proceso, realizamos regresiones no lineales de las curvas de apagamiento de la calceína para cada concentración de hierro. Ocupamos un ajuste basado en un modelo de ecuación de decaimiento exponencial de una fase (Figura 5A), obteniendo para cada curva un valor de constante de velocidad K . Al graficar estas constantes de velocidad en función de la concentración de hierro y hacer una regresión no lineal con un ajuste micaeliano (Figura 5B) obtuvimos para este proceso una velocidad máxima de $8,2 \pm 0,19 \text{ hrs}^{-1}$ y una $K_{0,5}$ de $0,4 \pm 0,087 \mu\text{M Fe}$. El gráfico de la Figura 5B mostró que desde la oferta 10 μM se alcanza la máxima velocidad de apagamiento de la calceína lo que es claro indicio que a partir de esta concentración el transporte de hierro se encuentra saturado.

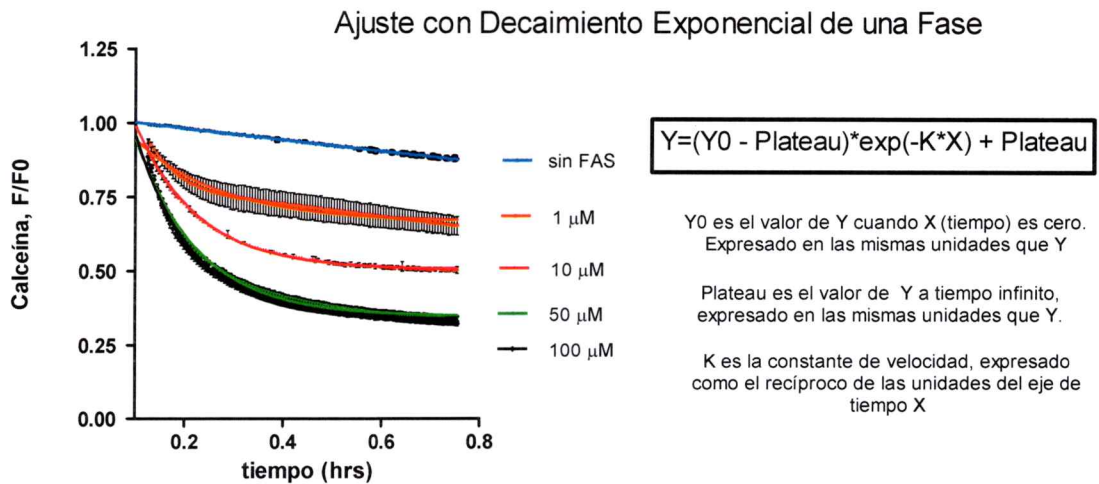
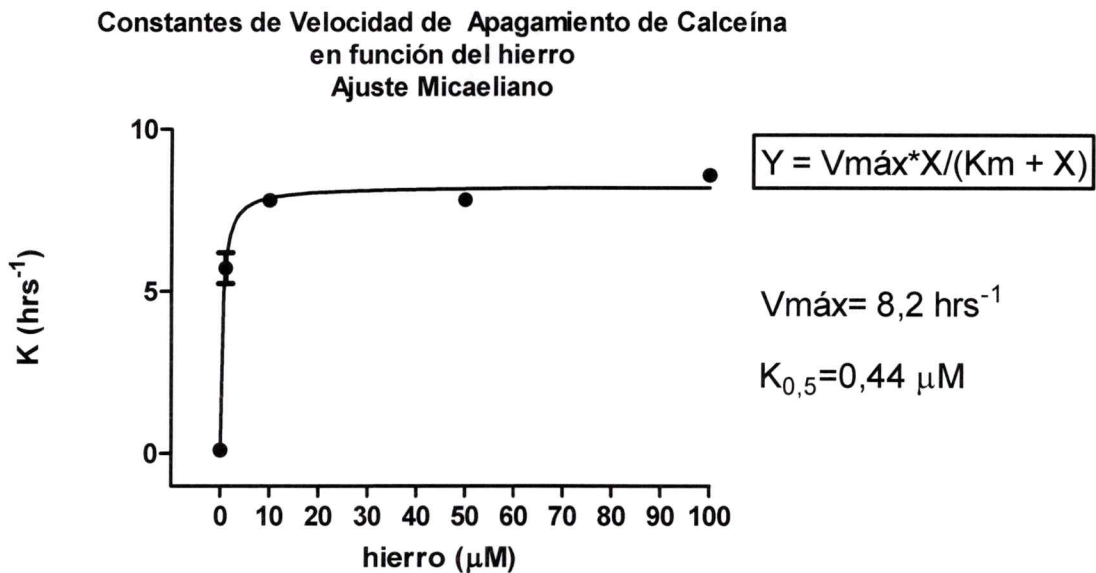
A**B**

Figura 5. Determinación de las constantes de velocidad de apagamiento de calceína y su dependencia de la concentración de hierro. (A) Regresión no lineal de las curvas obtenidas en la figura 4 con un ajuste de decaimiento exponencial de una fase. Para cada concentración de hierro se obtuvo un valor de K, la constante de velocidad de apagamiento de la calceína. **(B)** Constantes de velocidad de apagamiento de calceína en función de la concentración de hierro. El ajuste con ecuación micaeliana indicó una velocidad máxima de $8,2 \pm 0,19 \text{ hrs}^{-1}$ y una $K_{0,5}$ de $0,44 \pm 0,087 \text{ } \mu\text{M Fe}$.

Por otro lado, comprobamos que la oferta de FAS a las células Caco-2 provocó la generación de ROS, para lo cual las células fueron cargadas con la sonda DCDHF-DA. DCDHF-DA es hidrolizado al interior celular al compuesto no fluorescente 2',7'-diclorodihidro fluoresceína el cual emite fluorescencia al ser oxidado por ROS a 2',7'-dicloro fluoresceína (DCF). Por lo tanto, la fluorescencia emitida por DCF refleja directamente el status oxidativo de una célula (Núñez y cols., 2004).

Variando la concentración de FAS ofrecida, observamos que desde concentraciones de hierro 1 μM , la cinética de generación de ROS se diferenció claramente del prendimiento espontáneo de la sonda en ausencia de hierro (trazo azul, Figura 6). Concentraciones mayores de hierro provocaron que la sonda aumentara su fluorescencia aproximadamente 4 veces la fluorescencia inicial, tras 2 horas de registro. Estos resultados nos sorprendieron pues pensamos que dado que este tipo celular es un linaje que debe lidiar con concentraciones elevadas de hierro y otros oxidantes, debería tener un mecanismo eficiente de defensas antioxidantes. Datos de nuestro laboratorio nos indicaban que las células Caco-2 tienen niveles muy elevados de glutathione, el nivel más alto tras las células hepáticas. Sin embargo, estos experimentos nos mostraron claramente que la incorporación a la célula de hierro, desde la concentración más baja ocupada, provoca una robusta producción de ROS al interior de las células Caco-2. Esta generación de ROS inducida por hierro puede tener una función fisiológica al modificar el estatus oxidativo celular (Dröge, 2002).

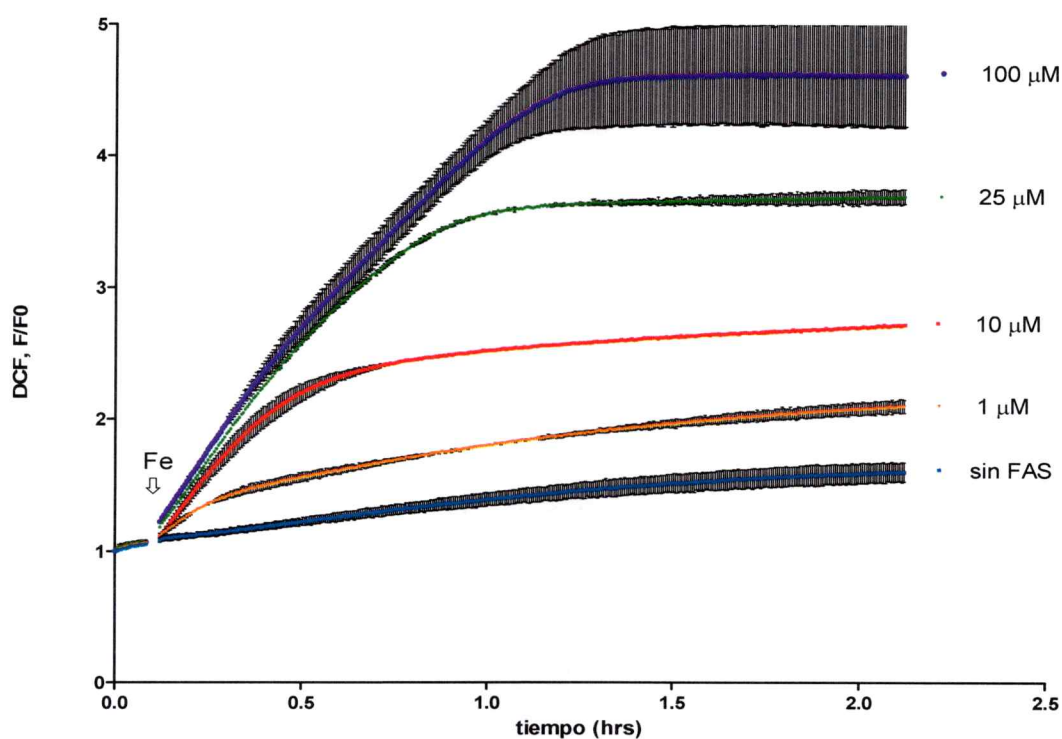


Figura 6. Generación de ROS inducida por el hierro entrante. Registros de emisión de fluorescencia de la sonda DCF inducida por diversas concentraciones de FAS. Se registró una línea base durante 5 minutos, tras lo cual se aplicó la cantidad de hierro correspondiente. Cada valor de fluorescencia está dividido por la fluorescencia inicial registrada, F/F_0 . Los valores corresponden a la media \pm la desviación estándar de dos determinaciones.

El análisis de las curvas de producción de ROS inducidas por la oferta con FAS, indicó que el aumento de la fluorescencia es lineal en los primeros 10 minutos tras la aplicación del hierro (Figura 7A) y que no hay gran diferencia en las pendientes de aumento de la fluorescencia provocada desde 10 μM hasta 100 μM . Realizamos regresiones lineales para cada curva y obtuvimos valores de pendientes a partir de las cuales, pudimos extraer valores de velocidad inicial de producción de ROS expresadas como variación de la fluorescencia en el tiempo. El gráfico de la velocidades iniciales de producción de ROS en función de la concentración de FAS indicó que este es un proceso

que también se satura rápidamente (Figura 7B). Al realizar un ajuste con ecuación micaseliana, obtuvimos para este proceso una velocidad inicial máxima de $4,2 \pm 0,14 \Delta F/hr$ y una $K_{0,5}$ de $1,2 \pm 0,2582 \mu M Fe$. Este gráfico también muestra que partir de FAS $10 \mu M$ se alcanza la velocidad inicial máxima de generación de ROS en el tiempo.

El ajuste micaseliano fue elegido considerando que tanto el apagamiento de la calceína como la producción de ROS son el resultado del proceso de entrada de hierro al LIP. Este proceso es el resultado de la actividad de transporte celular de hierro, realizado principalmente por DMT1. Para realizar el ajuste suponemos que lo observado para ambas sondas es consecuencia de la actividad de DMT1. Nuestro ajuste es válido si consideramos el hierro como el sustrato y la actividad de transporte como la actividad enzimática del transportador. Al aumentar el sustrato, la velocidad de transporte aumenta hasta un punto en el que por más que se ofrezca más sustrato, la velocidad de entrada al LIP permanece constante. La concentración umbral para que este fenómeno de saturación ocurra es desde FAS $10 \mu M$, donde se alcanza la máxima velocidad de entrada al LIP y la máxima velocidad inicial de producción de ROS (Figura 5B v/s Figura 7B). Esto corrobora el hecho que la producción de ROS es directamente resultado del aumento en la concentración del LIP (Breuer y cols., 2008).

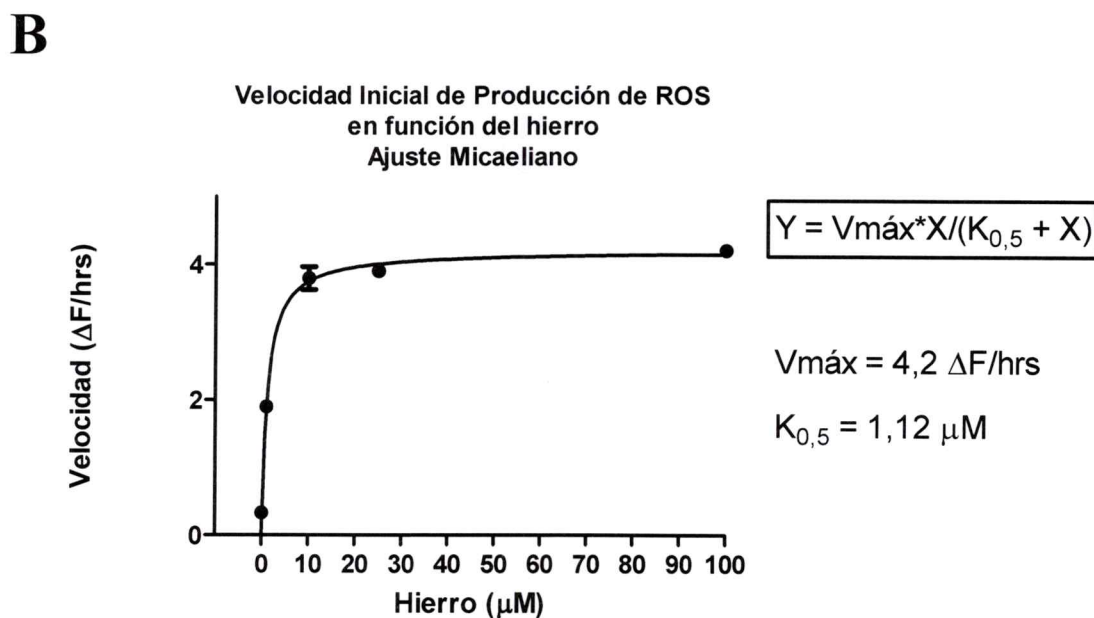
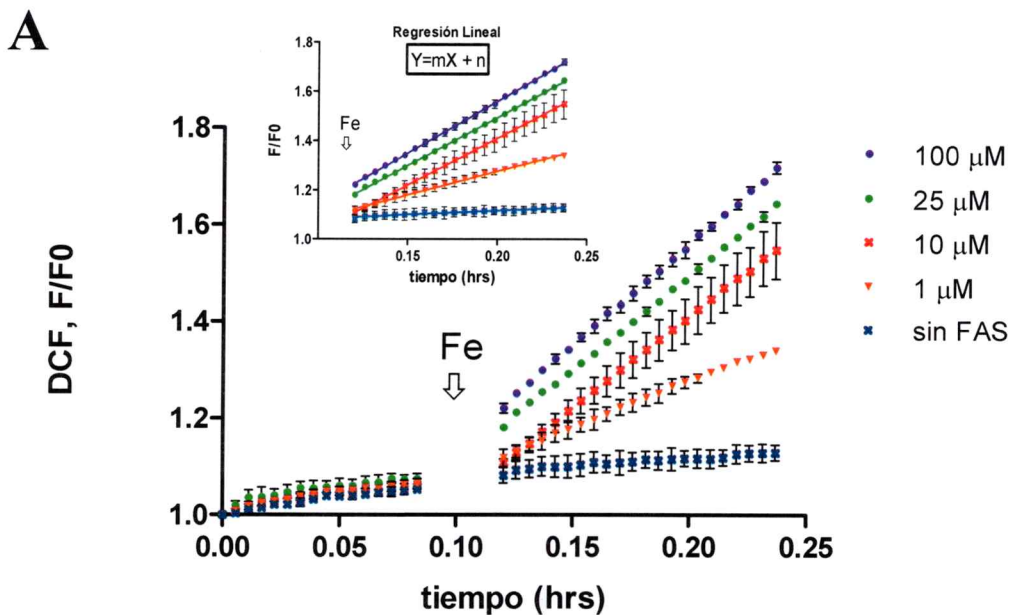


Figura 7. Velocidades iniciales de producción de ROS inducidas por la oferta de hierro. (A) Primeros 10 minutos del registro de producción de ROS (datos de Figura 6). Se observa que el hierro produce un aumento lineal de la fluorescencia. **(B)** Velocidades iniciales de la producción de ROS como función de la concentración de hierro. El ajuste con ecuación micaeliana indicó una velocidad máxima de $4,2 \pm 0,14 \Delta F/\text{hr}$ y una $K_{0,5}$ de $1,12 \pm 0,2582 \mu\text{M Fe}$.

3. Efecto del antioxidante general NAC en la endocitosis de DMT1+IRE inducida por hierro.

Debido a que la oferta de hierro induce la generación de ROS, nos propusimos estudiar si estas ROS participan en el proceso de endocitosis temprana de DMT1+IRE en respuesta al hierro apical. Para esto, primero investigamos el efecto que tiene la preincubación con NAC (un antioxidante general) en la internalización de DMT1+IRE en respuesta a hierro. Para esto preincubamos durante 1 hora con NAC 5 mM y tras ese período le ofrecimos FAS 20 μ M a las células Caco-2 durante 15 minutos. El NAC del medio de cultivo se mantuvo durante la oferta con FAS. Con esta preincubación interferimos el medio extracelular y el tono redox celular (El-Najjar y cols., 2010), pues el NAC se incorpora rápidamente a la célula, elevando los niveles de glutatión (Dekhuijzen, 2004) y además tiene un potencial directo como atrapador de ROS (Aruoma y cols., 1989). Observamos que en estas condiciones la internalización de DMT1 tras la adición de hierro no ocurrió (Figura 8). Interesantemente, la preincubación con NAC en ausencia de hierro aumentó la presencia de DMT1+IRE en la membrana apical significativamente, mientras que la oferta de hierro en estas condiciones en vez de internalizar DMT1+IRE, aumentó aún más la cantidad de DMT1+IRE en la membrana apical.

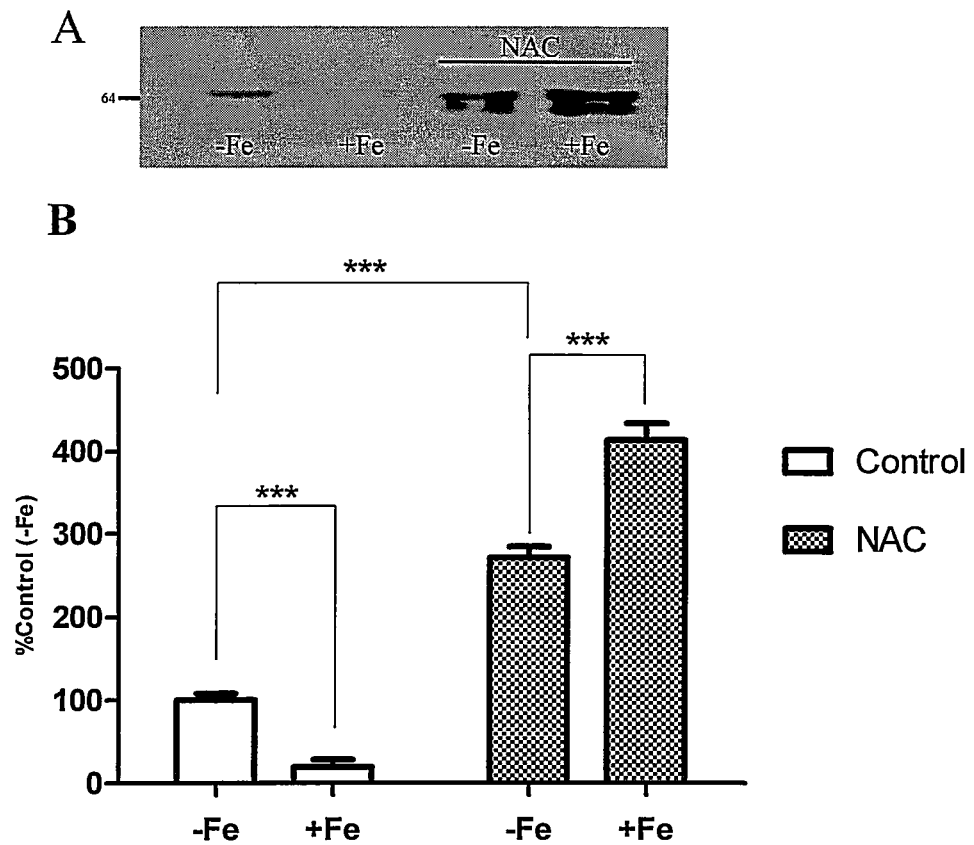


Figura 8. El antioxidante general NAC bloquea la endocitosis de DMT1+IRE inducida por hierro. (A) DMT1+IRE en la membrana apical en ausencia (-Fe) o presencia de hierro apical durante 15 minutos (+Fe). La preincubación durante 1 hora con NAC 5 mM bloqueó completamente la endocitosis de DMT1+IRE en respuesta al hierro. Además, provocó una acumulación de DMT1+IRE en la membrana apical. (B) Cuantificación mediante densitometría. Los valores corresponden a la media \pm la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Análisis estadístico, ANOVA *** $p < 0,001$.

4. Efecto del atrapador de radicales hidroxilo DMSO en la endocitosis de DMT1+IRE inducida por hierro.

Dados nuestros resultados con el antioxidante NAC, quisimos investigar el efecto que tiene un atrapador de ROS y para esto preincubamos las células Caco-2 con el atrapador del radical hidroxilo, DMSO (Repine y cols., 1987; Zucker y cols., 1997). Nuestra preincubación se realizó durante 30 minutos con una concentración de DMSO 0,4 % (5,08 mM) y al igual que con el NAC, no lo retiramos al ofrecerles a las células FAS 20 μ M. El DMSO dada su característica química liposoluble, se incorpora rápidamente a las células. En estas condiciones, la preincubación con DMSO es capaz de atrapar radicales hidroxilo intracelulares y extracelulares. Observamos que el DMSO no tuvo un efecto apreciable en la abundancia de DMT1+IRE en la membrana apical en ausencia de hierro (Figura 9). Sin embargo, en la presencia de DMSO la internalización de DMT1+IRE en respuesta al hierro apical se bloqueó completamente y el hierro en vez de internalizar DMT1+IRE resultó en una acumulación de DMT1+IRE en la membrana apical, al igual que en el caso anterior con NAC.

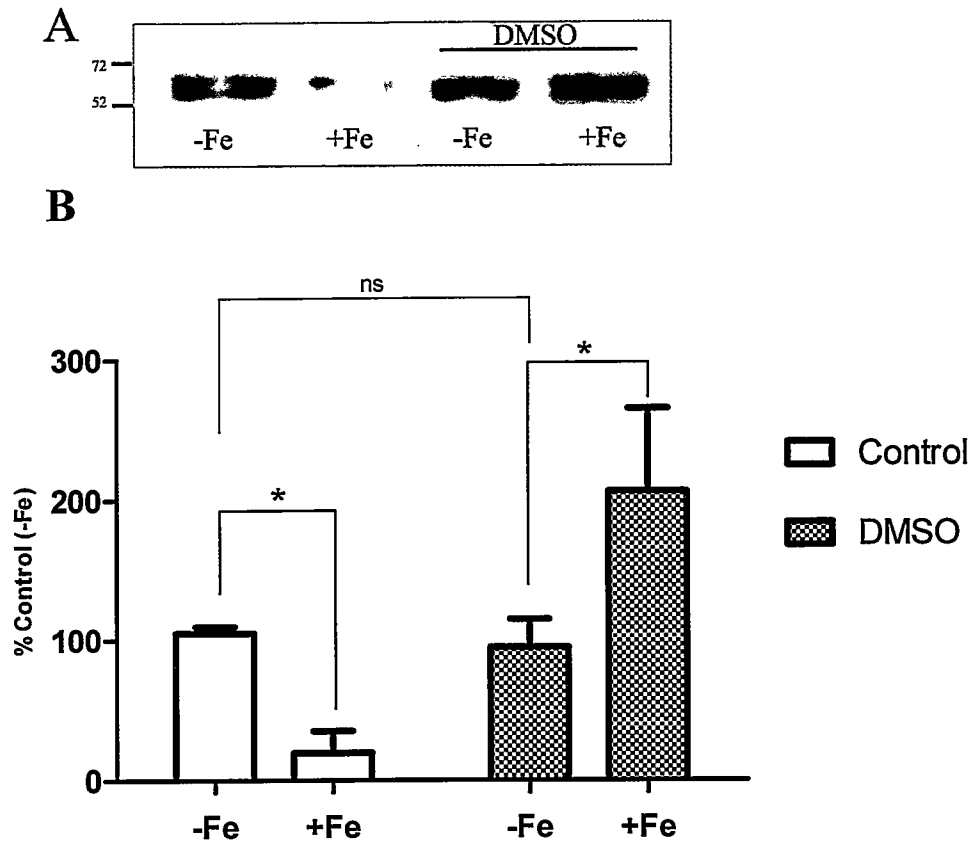


Figura 9. El atrapador del radical hidroxilo DMSO bloquea la endocitosis de DMT1+IRE inducida por hierro. (A) DMT1+IRE en la membrana apical en ausencia (-Fe) o presencia de hierro apical durante 15 minutos (+Fe). La preincubación durante 30 minutos con DMSO 0,4 % inhibió completamente la endocitosis de DMT1+IRE en respuesta al hierro. Además, indujo una acumulación de DMT1+IRE en la membrana apical en presencia de hierro. **(B)** Cuantificación mediante densitometría. Los valores corresponden a la media \pm la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Análisis estadístico, ANOVA * $p < 0,05$; ns $p > 0,05$.

5. Efecto de superóxido dismutasa y catalasa en la endocitosis de DMT1+IRE inducida por hierro.

Investigamos si la preincubación con SOD (superóxido dismutasa) y con catalasa podía detener de igual forma la endocitosis de DMT1 en respuesta a hierro. Estas proteínas apagan la producción de especies reactivas externas, pues permanecen mayoritariamente extracelulares (Weissenberg y cols., 2010). Utilizamos una preincubación con 100 U/mL de catalasa y de superóxido dismutasa durante 1 hora, y al igual que en los experimentos anteriores no retiramos estos agentes en el momento de ofrecerles a las células FAS 20 μ M. La interferencia en la generación de ROS extracelulares no tuvo un efecto significativo en la endocitosis de DMT1+IRE inducida por el hierro apical (Figura 10). En conjunto con los resultados anteriores, estos resultados muestran que la generación de ROS intracelulares que acompaña la entrada de hierro parece ser el factor primordial para desencadenar al endocitosis de DMT1+IRE en respuesta al hierro apical.

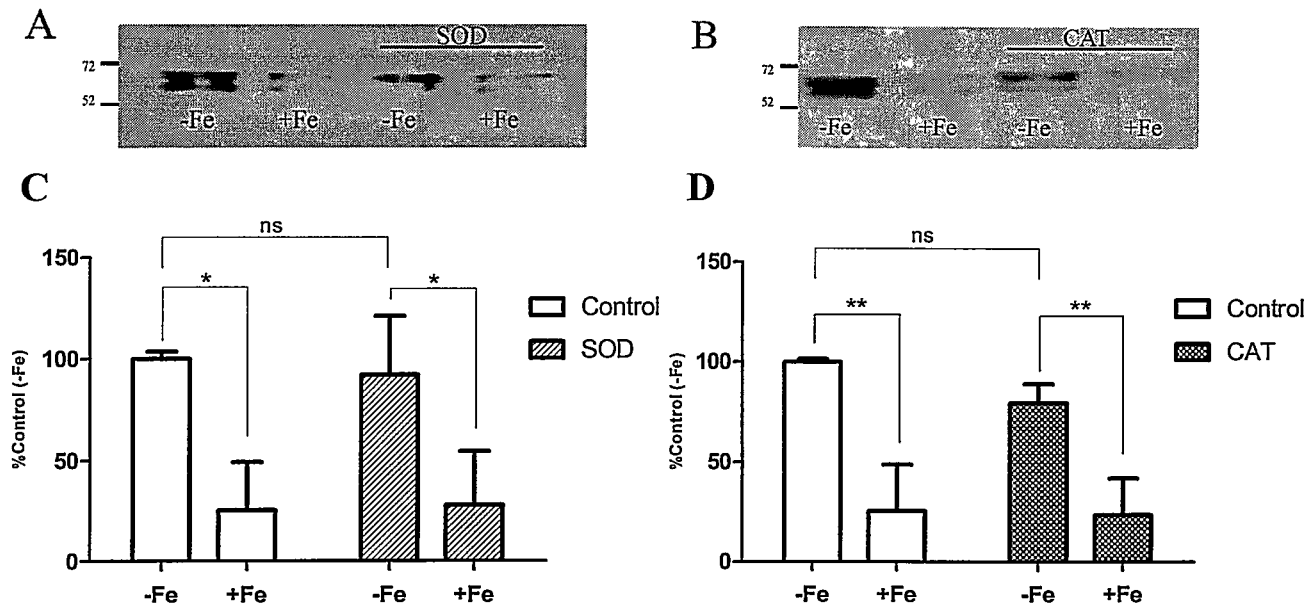


Figura 10. La preincubación con SOD y catalasa no bloquea la endocitosis de DMT1+IRE inducida por hierro. (A) DMT1+IRE en la membrana apical en ausencia (-Fe) o presencia de hierro apical durante 15 minutos (+Fe). La preincubación durante 1 hora con SOD 100 U/mL no bloqueó la endocitosis de DMT1+IRE en respuesta al hierro. **(B)** El mismo efecto se aprecia con el tratamiento con catalasa. **(C)** y **(D)** Cuantificación mediante densitometría. Los valores corresponden a la media \pm la desviación estándar de 3 réplicas biológicas. Análisis estadístico, ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns $> 0,05$.

6. Efecto de la administración de peróxido de hidrógeno en la endocitosis de DMT1+IRE.

Nuestros resultados previos muestran que la generación intracelular de ROS es necesaria para desencadenar la endocitosis de DMT1+IRE en respuesta al hierro apical. Pero, ¿serán suficientes para desencadenar la endocitosis de DMT1+IRE? Si son suficientes, ROS, en ausencia de hierro, podrían recrear el fenómeno de internalización de DMT1+IRE. Para probar esta hipótesis, incubamos las células con peróxido de hidrógeno 2 mM (concentración sugerida por Hernán Speisky, comunicación personal)

y seguimos la endocitosis apical de DMT1 mediante biotilación, comparando este efecto con el efecto que tuvo la oferta con FAS 20 μM durante 15 minutos. En la Figura 11, se muestra claramente que la adición de la ROS permeable peróxido de hidrógeno indujo la endocitosis de DMT1+IRE de una forma similar a la inducida por hierro. Estos resultados muestran que son las ROS producidas durante la entrada de hierro al citoplasma las responsables de desencadenar la endocitosis rápida de DMT1+IRE, y sugieren que la maquinaria de endocitosis de DMT1+IRE (la maquinaria accesoria o el propio DMT1+IRE) responde a cambios en el tono redox celular, permitiendo que este tipo de respuesta celular se lleve a cabo.

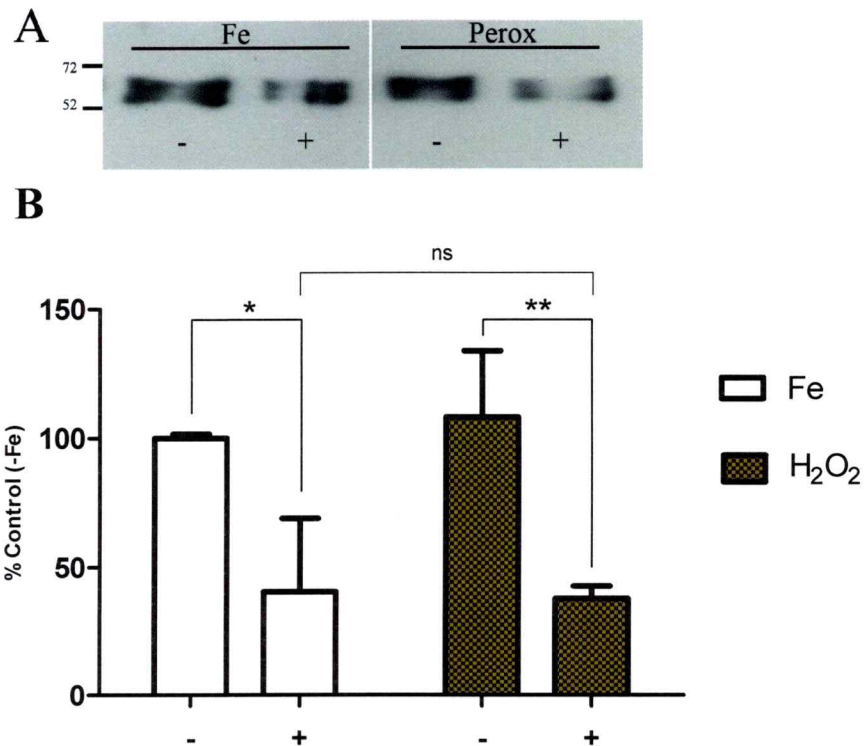


Figura 11. La incubación con peróxido de hidrógeno recrea la endocitosis de DMT1+IRE. (A) DMT1+IRE en la membrana apical en ausencia (-) o presencia (+) de FAS 20 μM y de peróxido de hidrógeno 2 mM durante 15 minutos. (B) Cuantificación mediante densitometría. Los valores corresponden a la media \pm la desviación estándar de 3 réplicas biológicas. Análisis estadístico, ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns $> 0,05$.

DISCUSIÓN

Ha sido demostrado que la isoforma DMT1-IRE se encuentra en equilibrio dinámico en estado basal y que existe un pool de membrana y un pool intracelular con tasas definidas de endocitosis y de exocitosis (Touret y cols., 2003). Si estas tasas permanecen constantes, los pools de membrana e intracelulares permanecen estables. En el caso de la abundancia constante en la membrana apical que observamos para DMT1+IRE en ausencia de hierro (Figura 3B), creemos que se debe a que en este caso, las tasas de endocitosis y exocitosis son estables. De esta manera, la desaparición de DMT1+IRE desde la membrana apical podría deberse a que el hierro aumenta la tasa de endocitosis manteniéndose constante la tasa de exocitosis, o bien porque se disminuye la tasa de exocitosis manteniéndose la tasa de endocitosis constante. Adicionalmente puede estimularse la endocitosis y bloquearse la exocitosis a la vez. Todas estas posibilidades terminan con una desaparición desde la membrana apical de DMT1+IRE. Un ejemplo paradigmático de este proceso es el caso del transportador de glucosa GLUT4, cuya presencia en la membrana plasmática se altera al modificarse las tasas de endo y/o exocitosis (Klip y cols., 2009). En estado basal sólo el 5 % del total de GLUT4 está en la membrana, pero en estados inducidos por carencia de energía o insulina, la abundancia de GLUT4 en la membrana plasmática se eleva a 50 % del total (Hou y Pessin, 2007). Por ejemplo, la carencia de oxígeno o malfuncionamiento mitocondrial por desacople de la cadena transportadora de electrones deriva en un aumento en la tasa de glucólisis anaeróbica, requiriéndose para ello mayor ingreso de glucosa (Klip y cols., 2009). Se ha descubierto que este proceso requiere la rápida ganancia de GLUT4 en la superficie, lo que se logra bloqueando la endocitosis más que promoviendo la exocitosis de los

transportadores, mediante un mecanismo dependiente de la kinasa AMPK y del aumento en la concentración de calcio interno (Klip y cols., 2009). En contraste, la insulina también desencadena la ganancia de GLUT4 en la membrana plasmática pero por un mecanismo distinto, promoviendo la exocitosis del transportador mediante un mecanismo dependiente de las kinasas PI3K y AKt (Klip y cols., 2009).

Este fenómeno es análogo a lo que podría suceder en el caso de DMT1+IRE. Postulamos que la endocitosis o la exocitosis de DMT1+IRE podrían ser controlada mediante la generación de ROS y el cambio que experimenta el tono redox celular producido al ingresar hierro al interior celular. Si el cambio en el tono redox puede afectar la endocitosis y/o la exocitosis de DMT1+IRE, es un antecedente relevante pues se sabe que la endocitosis de la isoforma DMT1-IRE ha mostrado depender de clatrina y dinamina, y su exocitosis, de PI3K, en estudios realizados en células LLC-PK1 de túbulo proximal de riñón de cerdo (Touret y cols., 2003), pero no existe ningún antecedente acerca de los factores que regulan la endocitosis o exocitosis de la isoforma DMT1+IRE. Para la isoforma DMT1-IRE se demostró que wortmanina, un inhibidor de PI3K, inhibe la exocitosis de DMT1-IRE resultando en un secuestro y una proporción intracelular aumentada de esta isoforma (Touret y cols., 2003). De la misma forma, un dominante negativo para dinamina o un RNA interferente contra una subunidad del complejo de internalización de clatrina, impide la endocitosis de esta isoforma (Touret y cols., 2003).

Si consideramos que la abundancia en la membrana apical de DMT1+IRE es el resultado del balance entre las tasas de endocitosis y exocitosis del transportador, los resultados con DMSO y NAC pueden ser explicados de la siguiente manera:

En estado basal, la abundancia en la membrana apical de DMT1+IRE es constante (Figura 3B), dado por que la concentración externa de hierro no varía estando las tasas de endocitosis y exocitosis en equilibrio. La entrada de hierro aumenta la endocitosis de DMT1+IRE mediante un mecanismo dependiente de ROS, pero también podría aumentar la exocitosis por un mecanismo independiente de ROS. Postulamos que en estas condiciones la tasa relativa de endocitosis es mayor que la de exocitosis, lo que resulta en una desaparición de DMT1+IRE desde la membrana apical (Figura 12 A)

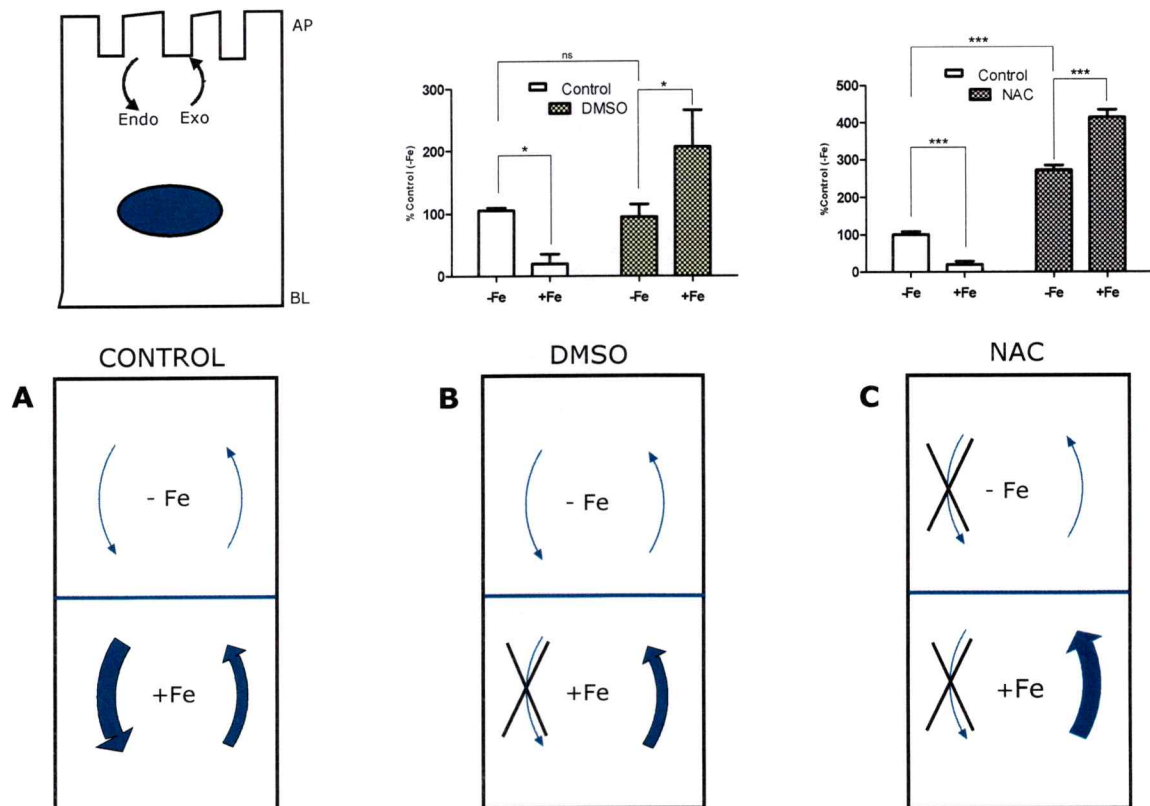


Figura 12. Esquema resumen. Las tasas de endocitosis y exocitosis de DMT1+IRE están representadas por flechas hacia abajo (interior celular) y hacia arriba (la membrana apical), respectivamente. Para explicar los resultados obtenidos con DMSO y NAC, proponemos que la endocitosis de DMT1+IRE depende de la generación de ROS y que además la entrada de hierro podría desencadenar un mecanismo que estimula la exocitosis independiente de ROS.

La preincubación con DMSO no tiene efecto en la abundancia de DMT1+IRE en la membrana apical (Figura 9), encontrándose las tasas relativas de endocitosis y exocitosis iguales a la situación control. Sin embargo, la entrada de hierro en estas condiciones es capaz de aumentar la exocitosis de DMT1+IRE de una forma similar a la situación control mediante el mecanismo independiente de ROS propuesto, siendo incapaz de aumentar la tasa de endocitosis de DMT1+IRE que depende de ROS. Debido a que en estas condiciones, la tasa de exocitosis se aumenta pero la endocitosis no puede ser inducida, el balance de ambas tasas desencadena una acumulación de DMT1+IRE en la membrana apical (Figura 12 B.)

La preincubación con NAC provoca un aumento en la abundancia de DMT1+IRE en la membrana apical en ausencia de hierro (Figura 8). En estas condiciones postulamos que el NAC, a diferencia del DMSO, puede bloquear en estado basal la endocitosis de DMT1+IRE dependiente de ROS, probablemente por su capacidad de alterar más el tono redox celular y por lo tanto una tasa de endocitosis basal bloqueada, frente a una tasa de exocitosis no alterada, resulta en la acumulación observada de DMT1+IRE en la membrana apical. En estas condiciones, es probable que la acumulación de DMT1+IRE en la membrana apical estimule aún más la entrada de hierro que en la situación control, lo que podría aumentar la exocitosis de DMT1+IRE por el mecanismo postulado independiente de ROS. Debido a que en estas condiciones el hierro no puede aumentar la endocitosis dependiente de ROS y ésta continúa bloqueada, pero sí aumenta la exocitosis de DMT1+IRE, la oferta con hierro resulta en la mayor acumulación observada de DMT1+IRE en la membrana apical (Figura 12C).

Por otro lado, interesante es también conocer hacia que compartimiento subcelular es destinado DMT1+IRE una vez internalizado. Con respecto a este punto, se ha descrito en células Caco-2 la presencia de un “endosoma común” donde proteínas internalizadas desde los dominios apical y basolateral coexisten (Knight y cols., 1995) y desde donde pueden ser recicladas de vuelta a su membrana de origen, destinadas a degradación lisosomal, o ser destinadas a la membrana opuesta, mediante transitososis (Mostov y cols., 2003).

Nuestros experimentos no pueden dilucidar si el fenómeno observado para DMT1+IRE en respuesta al hierro es parte del transporte normal del metal o es una respuesta regulatoria que sustenta el fenómeno de bloqueo mucosal. Pese a que observamos para las tres ofertas de hierro una desaparición desde la membrana apical tras 90 minutos de exposición a hierro, no podemos saber si en estos tiempos DMT1+IRE se destina a lisosomas y se degrada o se encuentra secuestrado intracelularmente, pues no medimos en nuestro sistema la estabilidad de DMT1+IRE en el tiempo. Sin embargo, ha sido publicado que en células Caco-2 una oferta de hierro 100 μM no afecta los niveles totales de DMT1 tras 24 horas de incubación (Johnson DM y cols., 2005). Así mismo, no seguimos la presencia de DMT1+IRE en la membrana basolateral, pero sería interesante determinar si a tiempos más tardíos de incubación con hierro se gatilla la transitososis de DMT1+IRE hacia la membrana basolateral donde podría comandar una respuesta de reversión a la carga de hierro, aumentando la captación basolateral (Núñez y cols., 2010). Para dilucidar si el fenómeno que observamos es una respuesta regulatoria o es parte del transporte normal del metal habría que seguir la endocitosis de DMT1+IRE a tiempos posteriores a 90 minutos pues,

si sigue retornando a la membrana apical en tiempos tardíos sería un indicio que esta relocalización es parte del normal transporte del metal, mientras que si en algún tiempo posterior a 90 minutos DMT1+IRE no retorna a la membrana apical y es secuestrado intracelularmente, podría ser un indicio que a estos tiempos, las células del epitelio intestinal se hacen refractarias a adquirir más hierro y detienen la incorporación del metal.

Los resultados presentados en este trabajo apuntan a que la desaparición rápida que experimenta DMT1+IRE desde la membrana apical en el resultado de una estimulación de la endocitosis en respuesta al hierro que depende de la generación de ROS en células del epitelio intestinal. De esta forma, debe existir en los segmentos intracelulares de esta isoforma algún determinante que sea susceptible de ser modificado oxidativamente. Analizando la secuencia de la isoforma 1A/+IRE (Figura 13), encontramos 2 cisteínas en el amino terminal que podrían potencialmente ser blanco de modificación oxidativa (C14 y C93). Adicionalmente existe una cisteína en el primer loop citosólico (C166) además de otra en el carboxilo terminal, en el segmento común entre las isoformas +IRE y -IRE (C558). Nuestros resultados apuntan a la posibilidad que alguna de estas cisteínas se modifique oxidativamente debido al ingreso de hierro, permitiendo que una señal de internalización específica para la isoforma +IRE previamente inactiva, se exponga y sea reconocida por maquinarias moleculares de internalización como caveolina o clatrina.

Ha sido propuesto que en el carboxilo terminal de la isoforma +IRE existe una putativa señal de internalización dileucina (Lam-Yuk-Tseung y Gros, 2006), (Figura 13).

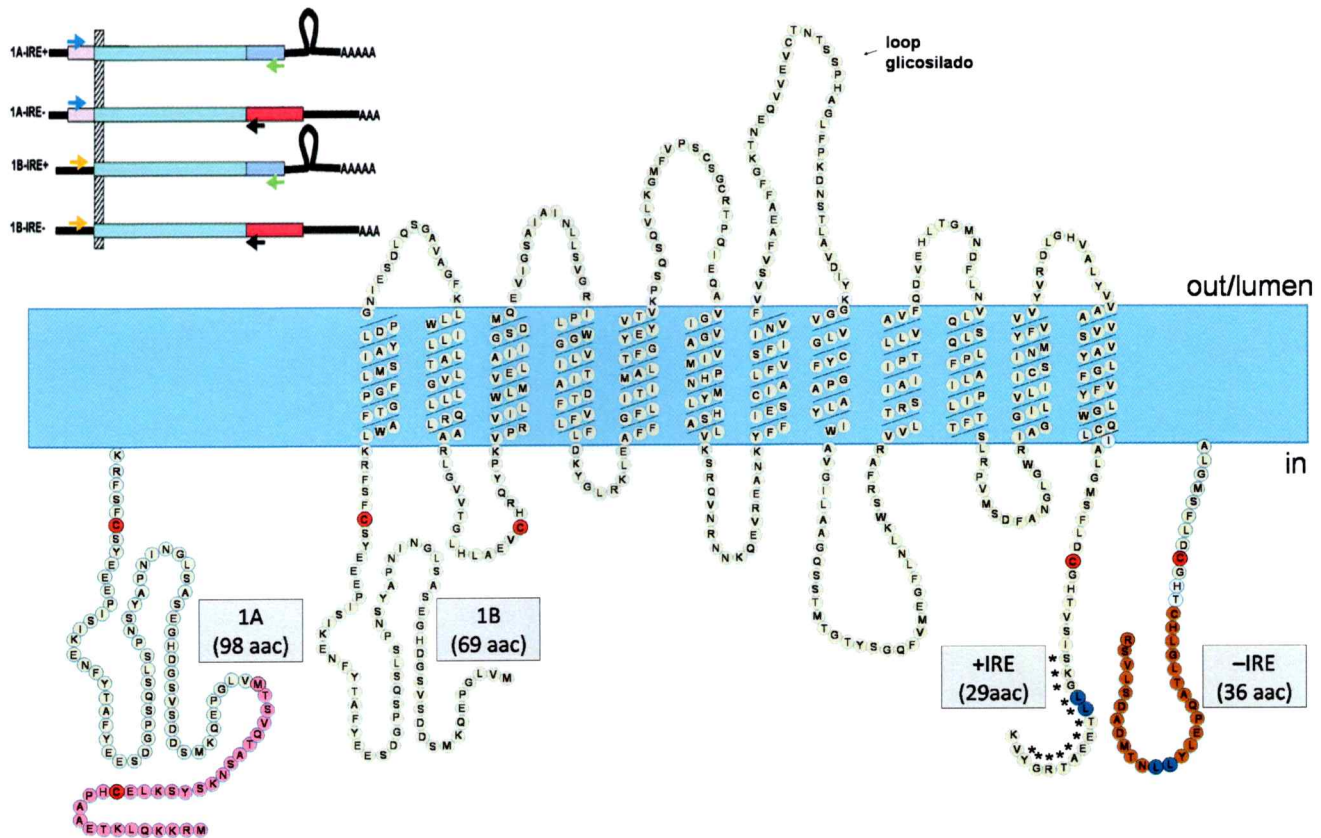


Figura 13. Esquema con la secuencia aminoacídica humana de las cuatro isoformas del transportador DMT1. En rojo se destacan las posibles cisteínas reactivas. En azul se destacan las putativas señales de internalización dileucina en los segmentos carboxilo terminales de las isoformas +IRE y -IRE. (Modificado de Lam-Yuk-Tseung y cols., 2005). En la esquina superior izquierda se muestra un esquema simplificado de las 4 isoformas de DMT1. (Tomado de Abouhamed y cols., 2006). Con asteriscos (*) están marcados los aminoácidos que reconoce el anticuerpo anti DMT1 +IRE.

Los motivos citoplasmáticos dileucina de proteínas de membrana a menudo actúan como señales que llevan a endocitosis mediada por clatrina o destinación a compartimientos endosomales/lisosomales (Lam-Yuk-Tseung y Gros, 2006). Esta señal en el carboxilo terminal de la isoforma +IRE podría estar inactiva en estado basal, cubierta por el resto de la cola carboxilo terminal. Esto podría explicar por qué en estado basal la endocitosis de la isoforma +IRE no parece depender de clatrina ni de dinamina y

se efectúa con cinéticas mucho menores comparada con la isoforma -IRE (Lam-Yuk-Tseung y Gros, 2006).

Sin embargo, en un estado en el que el hierro aumenta, la putativa modificación oxidativa inducida en la cisteína 558, como consecuencia de la entrada de hierro y la producción de ROS, podría cambiar conformacionalmente la estructura terciaria del segmento carboxilo terminal exponiendo esta señal dileucina, gatillando la endocitosis rápida que proponemos para la isoforma +IRE, y que resulta en una disminución de esta isoforma en la membrana apical.

Nuestros experimentos con agentes que interfieren la normal producción de ROS, sugieren que el tono redox debe ser mantenido en ciertos rangos para que este tipo de función celular se efectúe, y podrían sugerir que dosis excesivas de antioxidantes in vivo podrían bloquear o interferir en esta respuesta fisiológica e impedir que el intestino pueda responder de manera óptima a una oferta excesiva de este metal. De esta forma, la presencia de antioxidantes en la dieta podría aumentar supra-fisiológicamente la absorción de hierro. Ha sido demostrado en células Caco-2 que la presencia de β -caroteno, otro antioxidante, aumenta la incorporación de hierro (García-Casal y cols., 2000), lo que podría ser explicado por el aumento en abundancia en la membrana apical que observamos para DMT1. Por otro lado, si la endocitosis de DMT1+IRE se requiere para un óptimo paso transepitelial del hierro (Ma y cols., 2006) el bloqueo que inducen los agentes antioxidantes y bloqueadores de especies reactivas del oxígeno podría impactar negativamente el correcto transporte del metal. En este caso, al aumentar la cantidad de DMT1 en la membrana debido a un bloqueo en la endocitosis debería disminuir la incorporación de hierro. Para aclarar este punto deberíamos realizar

experimentos de transporte de hierro en las condiciones en las que observamos estos cambios de abundancia para DMT1 en la membrana apical.

Finalmente, nuestros experimentos con peróxido de hidrógeno nos permiten postular que la presencia de ROS independiente del hierro, pueden inducir la endocitosis de DMT1, pero esta interpretación tiene limitaciones. Debido a que el peróxido de hidrógeno también puede producir efectos adversos en la célula, deberíamos mostrar que en estas condiciones no se afecta la viabilidad celular y que la membrana apical está íntegra, para verificar que la caída en abundancia para DMT1 observada no se deba a que la membrana esté dañada. Para darle validez a este experimento, deberíamos mostrar que en presencia de peróxido de hidrógeno no se afecta la abundancia en la membrana apical de otra proteína como ferroportina, tal como fue determinado en la Figura 3.

PROYECCIONES

Los resultados presentados en este trabajo podrían ser relevantes para entender la regulación del transporte de hierro en el intestino, sin embargo, están realizados en un sistema celular que presenta una serie de limitaciones. La más importante, es que el cultivo celular proviene de una línea inmortalizada cuyo ciclo celular se encuentra desregulado en contraste con los enterocitos duodenales *in vivo*, los cuales tienen un ciclo de vida finito y están siendo reemplazados constantemente por nuevos enterocitos a partir de células madre. Nuestra primera proyección sería validar estos resultados en un modelo *in vivo*. Para realizar esto, podríamos trabajar con el epitelio intestinal de rata, realizar los tratamientos, e intentar biotinilar la membrana apical. Debido a que no está documentado en la literatura la biotilación de proteínas *in vivo* en este sistema tendríamos que montar la técnica.

Por otro lado para darle más peso a nuestros resultados, en los experimentos de biotilación deberíamos tener una aproximación diferente a la tinción con rojo ponceau como control de carga. Esto podría realizarse mediante la detección en las mismas membranas de nitrocelulosa de una proteína cuya abundancia en la membrana apical no se vea afectada en las condiciones usadas, como ferroportina. De esta forma, podríamos expresar nuestros resultados como una relación entre la abundancia de DMT1+IRE versus la abundancia de ferroportina. De esta manera, nuestros resultados estarían normalizados.

Si bien nosotros mostramos que los tratamientos con el atrapador de ROS DMSO y con el antioxidante NAC tienen un efecto sobre la abundancia de DMT1+IRE en la membrana apical, no mostramos que el pretratamiento con estos agentes tiene un

impacto directo en la producción de ROS medido como emisión de fluorescencia de DCDHF-DA. Los registros de emisión de ROS inducidos por hierro en presencia de DMSO y NAC deberían dar cuenta de la capacidad de estos agentes para interferir en el tono redox y complementar nuestros datos de biotinylación, para darles mayor validez.

Como se mencionó, también es necesario obtener datos de incorporación de hierro en nuestro sistema en ausencia y presencia de los agentes empleados. Para verificar que una mayor presencia de DMT1+IRE en la membrana apical se correlaciona con un mayor transporte y que la desaparición de DMT1+IRE desde el dominio apical se relaciona con un transporte menor de hierro. Para obtener estos datos de transporte, se puede ocupar hierro radioactivo (^{55}Fe) y realizar típicos experimentos de incorporación celular de hierro radioactivo. De esta forma, esperamos que la mayor cantidad de DMT1+IRE en la membrana apical que inducen DMSO y NAC se correlacione con una mayor incorporación de hierro.

Como una técnica complementaria a la biotinylación se podría ocupar una construcción fluorescente de DMT1+IRE acoplado a GFP. Esta construcción está disponible en nuestro laboratorio. Sería interesante comprobar que el movimiento de esta construcción en células Caco-2 transfectadas también se bloquea al preincubar con NAC y DMSO, y que puede ser inducido por peróxido de hidrógeno. Para realizar estos experimentos, habría que utilizar microscopía de fluorescencia confocal y seguir el movimiento del construcción fluorescente de DMT1+IRE a lo largo del eje z, en las condiciones detalladas en el presente trabajo.

Finalmente, nuestros datos apuntan a que una cisteína intracelular pudiera ser modificada oxidativamente para inducir la endocitosis de DMT1+IRE. Para demostrar

este punto se podrían hacer mutaciones sitio-dirigidas para reemplazar estas cisteínas y comprobar que las construcciones fluorescentes respectivas en células transfectadas pierden la capacidad de internalizarse en respuesta al hierro. Previo a esto, deberíamos mostrar que las mutaciones inducidas no impactan negativamente el transporte de hierro y que no tienen efecto en la correcta destinación subcelular de DMT1+IRE en condiciones basales.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

❖ Utilizando células Caco-2 crecidas en insertos bicamerales, un sistema modelo de absorción intestinal de hierro, se caracterizó cinéticamente la endocitosis del transportador DMT1+IRE inducida por la oferta de hierro. Logramos determinar en este sistema que el hierro indujo una masiva desaparición de DMT1+IRE desde el dominio apical tras 15 minutos de aplicación.

❖ La oferta de hierro apical generó en nuestro sistema una robusta generación de ROS, para un amplio rango de concentraciones de hierro usadas. Este fenómeno mostró ser un proceso que se satura rápidamente, al igual que la entrada de hierro al interior celular.

❖ El antioxidante NAC y el atrapador del radical hidroxilo DMSO bloquearon la endocitosis temprana de DMT1+IRE lo que es un claro indicio que la producción de ROS que acompaña la entrada de hierro es necesaria para que este proceso se efectúe.

❖ Los disipadores de ROS extracelulares SOD y catalasa no afectaron la internalización temprana de DMT1+IRE dependiente del hierro, lo que nos permite inferir junto a los resultados con NAC y DMSO que son las especies reactivas intracelulares las que participan en este proceso.

❖ La oferta con la ROS peróxido de hidrógeno recreó la endocitosis temprana de DMT1+IRE en ausencia de hierro lo que nos permite postular, junto con los resultados anteriores, que las ROS son necesarias y suficientes para inducir la endocitosis de DMT1+IRE.

Los resultados presentados en esta tesis nos permiten postular que en células Caco-2 el aumento de ROS citoplasmáticas producidas por el hierro entrante es determinante en desencadenar la endocitosis temprana de DMT1+IRE y sugieren que debe existir un motivo en alguno de los dominios intracelulares de DMT1 susceptible de ser modificado oxidativamente y que esta modificación desencadena la endocitosis rápida que experimenta DMT1+IRE en respuesta al hierro apical.

PRESENTACIÓN EN CONGRESO

La mayoría de los resultados de este seminario de título fueron presentados en un panel en la LIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile y IV Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Evolución, Santa Cruz, 21 al 24 de Noviembre 2010. Este trabajo fue titulado: “Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) median la Endocitosis del Transportador DMT1 Inducida por Hierro” (ROS mediate Iron-induced endocytosis of DMT1). De los autores: **Esparza, A.**, Tapia, V. y Núñez, M.T.

REFERENCIAS

Abouhamed, M., Gburek, J., Liu, W., Torchalski, B., Wilhelm, A., Wolff, N. A., Christensen, E. I., Thevenod, F. y Smith, C. P. (2006). Divalent metal transporter 1 in the kidney proximal tubule is expressed in late endosomes/lysosomal membranes: implications for renal handling of protein-metal complexes. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F1525-1533.

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

Arredondo, M., Tapia, V., Rojas, A., Aguirre, P., Reyes, F., Marzolo, M. P. y Núñez, M. T. (2006). Apical distribution of HFE-beta2-microglobulin is associated with inhibition of apical iron uptake in intestinal epithelia cells. *Biometals* 19, 379-388.

Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M. y Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 6, 593-597.

Beinert, H. y Kiley, P. J. (1999). Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Curr Opin Chem Biol* 3, 152-157.

Breuer, W., Shvartsman, M. y Cabantchik, Z. I. (2008). Intracellular labile iron. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 350-354.

Canonne-Hergaux, F., Gruenheid, S., Ponka, P. y Gros, P. (1999). Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* 93, 4406-4417.

Czachorowski, M., Lam-Yuk-Tseung, S., Cellier, M. y Gros, P. (2009). Transmembrane topology of the mammalian Slc11a2 iron transporter. *Biochemistry* 48, 8422-8434.

Dekhuijzen, P. N. (2004). Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 23, 629-636.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.

Dunn, L. L., Rahmanto, Y. S. y Richardson, D. R. (2007). Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol* 17, 93-100.

El-Najjar, N., Chatila, M., Moukadem, H., Vuorela, H., Ocker, M., Gandesiri, M., Schneider-Stock, R. y Gali-Muhtasib, H. (2010). Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling. *Apoptosis* 15, 183-195.

Frazer, D. M., Wilkins, S. J., Becker, E. M., Murphy, T. L., Vulpe, C. D., McKie, A. T., y Anderson, G. J. (2003). A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. *Gut* 52, 340-346.

García-Casal, M. N., Leets, I. y Layrisse, M. (2000). Beta-carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells. *J Nutr* 130, 5-9.

Graham, R. M., Chua, A. C., Herbison, C. E., Olynyk, J. K. y Trinder, D. (2007). Liver iron transport. *World J Gastroenterol* 13, 4725-4736.

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

Hahn, P. F., Bale, W. F., Ross, J. F., Balfour, W. M. y Whipple, G. H. (1943). Radioactive Iron Absorption by Gastro-Intestinal Tract : Influence of Anemia, Anoxia, and Antecedent Feeding Distribution in Growing Dogs. *J Exp Med* 78, 169-188.

Hawkins, C. L., Morgan, P. E. y Davies, M. J. (2009). Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic Biol Med* 46, 965-988.

Hidalgo, C., Carrasco, M. A., Muñoz, P. y Núñez, M. T. (2007). A role for reactive oxygen/nitrogen species and iron on neuronal synaptic plasticity. *Antioxid Redox Signal* 9, 245-255.

Hou, J. C. y Pessin, J. E. (2007). Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUT4 trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 19, 466-473.

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

Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D. y Johnson, M. K. (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* 74, 247-281.

Johnson, D. M., Yamaji, S., Tennant, J., Srani, S. K. y Sharp, P. A. (2005). Regulation of divalent metal transporter expression in human intestinal epithelial cells following exposure to non-haem iron. *FEBS Lett* 579, 1923-1929.

Klip, A., Schertzer, J. D., Bilan, P. J., Thong, F. y Antonescu, C. (2009). Regulation of glucose transporter 4 traffic by energy deprivation from mitochondrial compromise. *Acta Physiol (Oxf)* 196, 27-35.

Knight, A., Hughson, E., Hopkins, C. R. y Cutler, D. F. (1995). Membrane protein trafficking through the common apical endosome compartment of polarized Caco-2 cells. *Mol Biol Cell* 6, 597-610.

Knutson, M. y Wessling-Resnick, M. (2003). Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38, 61-88.

Lam-Yuk-Tseung, S., Touret, N., Grinstein, S. y Gros, P. (2005). Carboxyl-terminus determinants of the iron transporter DMT1/SLC11A2 isoform II (-IRE/1B) mediate internalization from the plasma membrane into recycling endosomes. *Biochemistry* 44, 12149-12159.

Lam-Yuk-Tseung, S. y Gros, P. (2006). Distinct targeting and recycling properties of two isoforms of the iron transporter DMT1 (NRAMP2, Slc11A2). *Biochemistry* 45, 2294-2301.

Ma, Y., Specian, R. D., Yeh, K. Y., Yeh, M., Rodríguez-Paris, J. y Glass, J. (2002). The transcytosis of divalent metal transporter 1 and apo-transferrin during iron uptake in intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G965-974.

Ma, Y., Yeh, M., Yeh, K. Y. y Glass, J. (2006). Iron Imports. V. Transport of iron through the intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G417-422.

Moriya, M. y Linder, M. C. (2006). Vesicular transport and apotransferrin in intestinal iron absorption, as shown in the Caco-2 cell model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G301-309.

Mostov, K., Su, T. y ter Beest, M. (2003). Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol* 5, 287-293.

Núñez, M. T., Gallardo, V., Muñoz, P., Tapia, V., Esparza, A., Salazar, J. y Speisky, H. (2004). Progressive iron accumulation induces a biphasic change in the glutathione content of neuroblastoma cells. *Free Radic Biol Med* 37, 953-960.

Núñez, M. T., Tapia, V., Rojas, A., Aguirre, P., Gómez, F. y Nualart, F. (2010). Iron supply determines apical/basolateral membrane distribution of intestinal iron transporters DMT1 and ferroportin 1. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C477-485.

Núñez, M. T. (2010). Regulatory mechanisms of intestinal iron absorption- Uncovering of a fast-response mechanism based on DMT1 and ferroportin endocytosis. *Biofactors* 36, 88-97.

Repine, J. E., Pfenninger, O. W., Talmage, D. W., Berger, E. M. y Pettijohn, D. E. (1981). Dimethyl sulfoxide prevents DNA nicking mediated by ionizing radiation or iron/hydrogen peroxide-generated hydroxyl radical. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 1001-1003.

San Martin, C. D., Garri, C., Pizarro, F., Walter, T., Theil, E. C. y Núñez, M. T. (2008). Caco-2 intestinal epithelial cells absorb soybean ferritin by mu2 (AP2)-dependent endocytosis. *J Nutr* 138, 659-666.

Scheers, N. M. y Sandberg, A. S. (2008). Ascorbic acid uptake affects ferritin, Dcytb and Nramp2 expression in Caco-2 cells. *Eur J Nutr* 47, 401-408.

Stewart, W. B., Yuile, C. L., Claiborne, H. A., Snowman, R. T. y Whipple, G. H. (1950). Radioiron absorption in anemic dogs; fluctuations in the mucosal block and evidence for a gradient of absorption in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 92, 375-382.

Tabuchi, M., Tanaka, N., Nishida-Kitayama, J., Ohno, H. y Kishi, F. (2002). Alternative splicing regulates the subcellular localization of divalent metal transporter 1 isoforms. *Mol Biol Cell* 13, 4371-4387.

Touret, N., Furuya, W., Forbes, J., Gros, P. y Grinstein, S. (2003). Dynamic traffic through the recycling compartment couples the metal transporter Nramp2 (DMT1) with the transferrin receptor. *J Biol Chem* 278, 25548-25557.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J. y Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266, 37-56.

Valko, M., Morris, H. y Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12, 1161-1208.

Weissenberg, A., Sydlik, U., Peuschel, H., Schroeder, P., Schneider, M., Schins, R. P., Abel, J. y Unfried, K. (2010). Reactive oxygen species as mediators of membrane-dependent signaling induced by ultrafine particles. *Free Radic Biol Med* 49, 597-605.

Yeh, K., Yeh, M., Watkins, J., Rodriguez-Paris, J. y Glass, J. (2000). Dietary iron induces rapid changes in rat intestinal divalent metal transporter expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G1070-1079.

Zucker, B., Hanusch, J. y Bauer, G. (1997). Glutathione depletion in fibroblasts is the basis for apoptosis-induction by endogenous reactive oxygen species. *Cell Death Differ* 4, 388-395.