

FERRITINA : ¿ELEMENTO REGULADOR DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE HIERRO ?

Universidad de Chile

Facultad de Ciencias

Tesis Entregada en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención Biología

Por

Marco Antonio Gárate Madariaga

Mayo, 1999

Director de Tesis: Dr. M. Tulio Núñez Director Alternativo: Dr. Ariel Orellana

Esta tesis fue financiada por los proyectos FONDECYT 1970465 y Cátedra Presidencial en Ciencia del Dr. M.Tulio Nunez y por los proyectos DTI 024 y FONDECYT 2970003 de Marco Gárate.

RESUMEN .	1
ABSTRACT .	3
..	5
..	7
..	9
..	11
AGRADECIMIENTOS .	13
ABREVIATURAS . .	15
1. INTRODUCCIÓN .	17
NATURALEZA DEL PROBLEMA .	25
HIPÓTESIS DE TRABAJO . .	26
OBJETIVOS .	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS .	29
2.1 Materiales . .	29
2.1.1 Reactivos . .	29
2.1.2 Equipos .	30
2.1.4. Material Biológico .	30
2.2 Métodos .	32
2.2.1 Preparación de SBF bajo en Fe . .	32
2.2.2 Obtención de células Caco-2 con distinta [Fe]_i . .	32
2.2.3 Obtención de extractos celulares . .	33
2.2.4 Determinación de Fn por ensayo de ELISA . .	33
2.2.5 Unión de Proteína A a BrCN-sefarosa .	34
2.2.6 Determinación del contenido de Fe en Fn .	34
2.2.7 Fraccionamiento subcelular en gradientes continuos de sacarosa .	35
2.2.8 Determinación de actividades de enzimas marcadoras de organelos .	35
2.2.9 Electroforesis bajo condiciones no denaturantes .	35

2.2.10 Electroforesis bajo condiciones denaturantes .	35
2.2.11 Autoradiografía . .	36
2.2.12 Detección de Fn mediante técnica de inmunodetección (Western blot) . .	36
2.2.13 Preparación de apoFn .	36
2.2.14 Preparación de holoFn . .	37
2.2.15 Inmunolocalización utilizando microscopía confocal . .	37
2.2.16 Determinación de $t_{1/2}$ de Fn .	37
2.2.17 Electroelución de proteínas provenientes de geles no denaturantes . .	37
2.2.18 Inmunodetección de otras proteínas involucradas en la absorción intestinal de Fe . .	38
2.2.19 Determinación de la absorción de Fe respecto a la $[Fe]_i$.	38
2.2.20 Incubación de células con Zn^{2+} .	38
2.2.21 Determinación del estado de óxido-reducción celular . .	38
2.2.22 Determinación de actividad GSH-Px . .	39
2.2.23 Determinación de actividad GSSG-Rd .	39
2.2.24 Determinación de proteína .	39
2.2.25 Análisis estadístico .	40
3. RESULTADOS . .	41
3.1 Relación contenido de Fn respecto a la $[Fe]_i$, en células intestinales . .	41
3.2 Determinación del Fe contenido en Fn a diferentes $[Fe]_i$. .	42
3.3 Determinación de la localización subcelular de la Fn . .	44
3.4 Grado de saturación de poblaciones de Fn que presentan diferente localización subcelular .	47
3.5 Determinación de la capacidad de almacenaje de Fe de la Fn. Uso de geles nativos .	48
3.6 Determinación de la composición de subunidades de los oligómeros de Fn. Uso de geles denaturantes .	49
3.7 Determinación del cambio de densidad de fraccionamiento de la Fn frente a la adición de detergente Np40, previo al fraccionamiento .	50
3.8 Distribución subcelular de la Fn vesiculada. Microscopía confocal .	52
3.9 Caracterización de los compartimentos en que se localizan las diferentes	55

poblaciones de Fn . .	
3.10 Papel de la Fn en la unión de Fe de flujo .	57
3.10.1 Fraccionamiento isopícnico del Fe de flujo incorporado a la célula . .	57
3.10.2 Incorporación de Fe de flujo a Fn . .	58
3.11 Determinación de la movilidad electroforética del Fe de flujo incorporado al citosol. Posibles proteínas que presentan un papel en la unión de Fe . .	59
3.12 Efecto del bloqueo funcional de Fn, mediante la adición de Zn^{2+} , sobre la incorporación de Fe de flujo a Fn .	61
3.13 Efecto del bloqueo funcional de Fn, mediante la adición de Zn^{2+} , sobre el flujo transepitelial de Fe .	62
3.14 Relación estado de óxido-reducción celular, respecto a la $[Fe]_i$. .	63
3.15 Actividades GSH-Px y GSSG-Rd respecto a la $[Fe]_i$.	64
3.16 Movilización de Fe almacenado, mediante la adición de t-butOOH . .	65
3.17 Influencia de la adición de t-butOOH, sobre la absorción de Fe .	66
4. DISCUSIÓN .	69
5. CONCLUSIONES . .	81
6. BIBLIOGRAFÍA .	83
APÉNDICE DE SOLUCIONES .	91

RESUMEN

El hierro es a nivel de elemento traza, un nutriente esencial para todos los organismos vivientes. Su especial configuración electrónica le permite participar en el desarrollo de diversas funciones biológicas, tales como transporte de oxígeno, fijación de nitrógeno, detoxificación y variadas reacciones de fotosíntesis. En forma natural se le encuentra en 2 estados de oxidación: Fe^{2+} el cual presenta una solubilidad de 10^{-1} M en solución acuosa a pH neutro y carácter prooxidante, y Fe^{3+} de baja solubilidad en solución acuosa a pH 7,0 (10^{-17} M). Debido a estas características, en medios biológicos el hierro se distribuye principalmente asociado a proteínas (60-70 % en hemoglobina, 10 % en mioglobina, citocromos y otras enzimas que contienen hierro y 20-30 % en proteínas de almacenamiento como ferritina y hemosiderina). El balance metabólico del hierro es regulado finamente: en humanos se absorben y eliminan 1-2 mg de hierro al día. Dicho balance es controlado por el proceso de absorción intestinal de este ión. En los enterocitos, al igual que en las demás células del organismo, la absorción de hierro parece ser regulada por su propio nivel intracelular, ya que altos niveles de hierro intracelular inhiben y bajos niveles aumentan su absorción. En la actualidad se postula que dicha regulación es controlada por el sistema IRE/IRP. A través de este sistema el nivel de hierro intracelular regula traduccionalmente la expresión de proteínas involucradas en su transporte y almacenaje celular. Así, al aumentar la concentración intracelular de hierro, disminuye los niveles de receptor de transferrina y aumentan los de ferritina, transformándose los enterocitos en células más almacenadoras y con menor capacidad de absorción de este ión. Por el contrario, a baja concentración intracelular de hierro, las células aumentarían sus niveles de receptor de transferrina y disminuirían los de ferritina, transformándose en células con alta capacidad de absorción y baja capacidad de retención del ión. Este análisis teórico, realizado en base a la proposición de que el sistema IRE/IRP regula la absorción intestinal de hierro, no concuerda del todo con observaciones previas que indican que en estado de deficiencia de hierro aumentan tanto la absorción, como la retención de hierro en las células intestinales. En este proceso, las proteínas de almacenaje de hierro podrían cumplir un papel fundamental. La ferritina es la principal proteína almacenadora de hierro. Una molécula de ferritina puede almacenar más de 3.000 átomos de hierro. Esta capacidad de almacenamiento de hierro de la ferritina puede ser bloqueada por iones como Zn^{2+} y Tb^{3+} . La cinética de almacenaje de hierro en ferritina puede ser alterada por la presencia de oxidantes o reductores. Además, dado que la ferritina responde a los niveles intracelulares de hierro, podría cumplir un papel importante en definir su destino en células que absorben hierro.

En esta tesis se propuso estudiar si la Fn regula la absorción de Fe en células del epitelio intestinal, al determinar, por unión del Fe recientemente incorporado, la relación Fe transportable : Fe. Se cultivó células Caco-2 en insertos bicamerales equilibradas con diferentes concentraciones de ^{55}Fe . De esta manera, el ^{55}Fe representa el hierro almacenado en las células. Con estas células realizamos estudios de flujo adicionando ^{59}Fe -NTA al medio apical. Por lo tanto, ^{59}Fe representa el hierro recientemente incorporado o hierro de tránsito. Se determinó, utilizando técnicas de inmunoprecipitación y fraccionamiento subcelular, como estas dos especies de hierro interactúan con ferritina a diferentes concentraciones intracelulares de este ión. Con el objetivo de determinar la influencia de ferritina sobre el destino del hierro en tránsito citoplasmático, se generó cultivos celulares con ferritina bloqueada funcionalmente, mediante la adición de Zn^{2+} , para estudiar el transporte transepitelial de hierro respecto a células que presentaban ferritina no bloqueada. Finalmente se estudió si las condiciones de cultivo a

diferentes concentraciones de hierro alteraban el estado de óxido-reducción celular y de esta forma el almacenaje y liberación del ión desde ferritina. Para esto, se determinó la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) a diferentes concentraciones intracelulares de hierro. Posteriormente se alteró el estado de óxido-reducción celular adicionando t-butilhidroperóxido y se determinó si esto influye sobre el almacenamiento en ferritina.

Los resultados indican que en células Caco-2 la ferritina cumple el papel de principal proteína almacenadora de hierro, presentando aproximadamente el 80 % de este ión a cualquier concentración intracelular de hierro estudiada. Al aumentar la concentración intracelular de este ión aumentan los niveles de ferritina, pero el nivel de hierro intracelular aumenta en mayor grado que el nivel de ferritina. Fraccionamiento de extractos celulares en gradientes de sacarosa indican que la densidad de equilibrio de ferritina aumenta respecto al contenido de hierro que presenta esta molécula. Así, en un rango de concentraciones intracelulares de hierro “Deficiente-Normal”, la ferritina aumenta su densidad de equilibrio desde 1,03-1,06 g/ml a 1,08-1,12 g/ml. En células cultivadas en situación de “Sobrecarga” del ión se detecta una población de ferritina diferente, la cual fracciona a densidades de 1,13-1,16 g/ml. Esta ferritina de alta densidad se localiza en un compartimento vesiculado perinuclear. La corta $t_{1/2}$ (6,5 h) de esta ferritina vesiculada, permiten postular que se encontraría en proceso de degradación, posiblemente inducida por el estado de sobrecarga de hierro. La adición de Zn^{2+} al medio de cultivo, permitió el bloqueo funcional de la ferritina, con lo cual aumentó el flujo transepitelial del hierro hacia el espacio basolateral. Este efecto fue más notable en células cultivadas a baja concentración intracelular de hierro, sugiriendo que la ferritina cumple un papel limitado en la unión de hierro de flujo a nivel citosólico, dependiente de su grado de saturación de hierro que esta molécula presente. Determinación de otras proteínas con capacidad de unir hierro de flujo sugieren que calreticulina y en especial una proteína de 70 kDa (P70), de naturaleza desconocida, podrían cumplir un papel más importante que ferritina en este proceso. Un desbalance oxidativo puede disminuir tanto la incorporación como el flujo transepitelial de hierro en células Caco-2. Sin embargo, no afecta de manera importante la unión de hierro de flujo por parte de ferritina. Este desbalance oxidativo disminuye la unión de hierro de flujo por parte de calreticulina y P70 en un 50 %, permitiendo postular que estas proteínas presentarían un papel más importante que ferritina, en la unión y destinación de este ión.

Los resultados presentados en esta tesis, permiten concluir que en las células Caco-2 la ferritina es la principal proteína almacenadora de hierro, una Fe de flujo en relación inversa a su grado de saturación en este ión y disminuye el pool de hierro transportable en células en estado de deficiencia de hierro. Calreticulina y en especial P70 parecen jugar un papel más importante que ferritina en la unión y destinación del hierro transportable.

ABSTRACT

Iron is an essential nutrient required by all living organisms. Its particular electronic configuration upholds its role in several biologic functions as oxygen transport, nitrogen fixation and photosynthesis. Iron has 2 stable oxidation states: in the 2+ state it has a maximal solubility of 10^{-1} M in aqueous solutions at neutral pH and has pro-oxidant character. In the 3+ state iron has low solubility in aqueous solutions (10^{-17} M at pH 7,0). Because of these properties, in biological systems iron is always associated to proteins: haemoglobin-associated iron comprise 60-70 % of total body iron, while iron associated to myoglobin, cytochromes and other iron-containing proteins comprise a further 10 %. The remaining 20-30 % is equally distributed between the two iron storage proteins: ferritin and haemosiderin. The metabolic balance of iron is tightly regulated: in humans 1-2 mg of iron are lost and recovered daily. This body iron balance is controlled at the level of the intestinal absorption of this ion. In enterocytes, as in other cells, its own intracellular levels regulate iron uptake, so high intracellular iron levels inhibit and low levels increase iron absorption. At present a regulation based in the IRE/IRP system is postulated. Through this system, intracellular iron levels regulate the expression of iron transport and iron storage proteins at the translational level. Thus high intracellular iron levels decrease transferrin receptor levels and increase ferritin levels, so cells increase their iron storage capacity and decrease their iron absorption capacity. Contrarily, low intracellular iron levels increase transferrin receptor levels and decrease ferritin levels, so cells become more absorptive and with a lower capacity to bind iron. The proposition that intestinal iron absorption is regulated through the IRE/IRP system, is not in accordance with previous descriptions indicating that in the anemic state intestinal cells increase both iron absorption and iron retention. In this process, iron storage proteins could play a principal role. Ferritin is the main iron storage protein. One molecule of ferritin can store more than three thousand molecules of iron. This iron storage capacity can be blocked by some cations as Zn^{2+} and Tb^{3+} . Oxidative or reductive molecules can modify the iron-storage capacity of ferritin. Furthermore, ferritin synthesis responds to intracellular iron levels, so ferritin could play an important role defining the destination of iron in absorptive cells.

In this thesis work, we studied if ferritin, plays a role as an intracellular element controlling the trans epithelial transport of iron. We cultured Caco-2 cells, in a bicameral chamber system, and equilibrated them to different ^{55}Fe concentration. In this way ^{55}Fe represented mostly storage iron. Then we used these cells in flux studies adding ^{59}Fe -NTA in the apical media. ^{59}Fe then represented newly entered or transit iron. We determined using immunoprecipitation and cell fractionation how these two pools of iron interact with ferritin, in cells having different intracellular ^{55}Fe concentrations. To determine the influence of ferritin over the transit iron destination, we obtained cell cultures in which the iron-storage capacity of ferritin was functionally blocked. Finally, we determined if the iron concentration in the culture media influenced the redox state of the cells and in this way modified the iron-storage capacity of ferritin. To that end, we determined the reduced glutathione/oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratio, at different intracellular iron concentration. We also modified the cellular redox state adding t-butylhydroperoxide and studied the iron transport capacity and the capacity of iron storage in ferritin of these cells.

The results presented in this thesis work show that in Caco-2 cells ferritin is the main iron storage protein, containing about 80 % of the cellular iron at any intracellular iron concentration studied. Increasing intracellular iron concentrations resulted in increased levels of ferritin.

Therefore, ferritin saturation increases when the intracellular iron concentration increases. Sucrose density gradients of cell homogenates indicated that ferritin increased its density when its iron content increased. So, at “Anemic-to-Normal” iron level ferritin shift its equilibrium density from 1,03-1,06 g/ml to 1,08-1,12 g/ml. In cells cultured at Overloading iron level a new pool of ferritin fractionating at 1,13-1,16 g/ml was detected. This high-density ferritin was found in a perinuclear vesicular compartment. The short half-life of this ferritin ($t_{1/2}$ 6,5 h), let us postulate that this ferritin could be in a degradation process and that this process could be induced by iron overload. Addition of Zn^{2+} to the culture media functionally blocked the iron-storage capacity of ferritin, and this effect increased the transepithelial ^{59}Fe flux. This effect was more marked at low intracellular iron concentrations, suggesting that ferritin plays a limited role in the handling of the transit iron pool. Analysis of other cytosolic proteins that could bind ^{59}Fe indicated that calreticulin and a 70 kDa protein, could play a role more relevant than of ferritin in the handling of the transit iron. An oxidative insult can decrease iron incorporation and transepithelial flux in Caco-2 cells. However, the flux iron binding in ferritin is not affected. This oxidative insult decreases calreticulin and P70 iron binding, and let us postulate this proteins as more important elements in iron binding and destination.

The results presented in this thesis work, let us conclude that in Caco-2 cells ferritin is the main iron-storage protein, binds flux iron in inverse relation to its saturation grade decreasing the labil iron pool in iron deficient cells. Calreticulin and P70 seem to play more important role than ferritin in binding and destination of transportable iron.

DEDICATORIA

A mis Padres y a Ricardo Guerra, por ser los guías anónimos de mi camino.

A mis hijas Danitza y Alicia, por ser la motivación para seguir caminando.

A mi esposa Ibis por ser mi compañera en este caminar.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Tulio Núñez, por su apoyo y por permitirme realizar esta tesis bajo su dirección, con independencia.

Al Dr. Ariel Orellana, por su apoyo y generosidad en el desarrollo de este trabajo.

A los Drs. José Minguell y Alfonso González, por su crítica y aporte constructivo.

A los Drs. Mario Luxoro, José Chianalle, Federico Leighton y Luis Valladares, por su disposición en aportar a la culminación de este escrito.

A los miembros del laboratorio de Membranas, a los que ya no están y a los incorporados recientemente, pero en especial a Lorena y Victoria por su amistad y cooperación, a Patricia por su colaboración en este trabajo y a Claudia por su generosidad espontánea.

AL Dr. Fernando Zambrano, por su preocupación, apoyo y generosidad.

A todos los que de una u otra forma colaboraron con este trabajo.

ABREVIATURAS

ARNm : ácido ribonucleico mensajero

BSA : seroalbúmina de bovino

Cél : Células

CHELEX 100 : resina quelante, ligando: ácido iminodiacético (forma sodio)

Cr : calreticulina

DCT1 : transportador de cationes divalentes

DE : desviación estándar

DMEM : medio mínimo esencial Dulbecco

DO : densidad óptica

DTNB : ácido ditio-bis-nitrobenzoico

DTT : ditioneitol

EDTA : ácido etilendiaminotetracético

ELISA :enzyme-linked immunosorbent assay

Fe : hierro

[Fe]_i : concentración intracelular de hierro

GSH : glutatión reducido

GSH-Px : glutatión peroxidasa

GSSG : glutatión oxidado

GSSG-Rd : glutatión reductasa

HEPES : N-[2 - hidroximetil] piperazina - N' - [ácido 2 -etanosulfónico]

IRE : (iron responsive element), elemento de respuesta al hierro

IRP : (iron regulatory protein), proteína regulada por hierro

kDa : kilodalton

LDH : deshidrogenasa láctica

LIP : (Labile iron pool), pool de hierro lábil

Mf : mobilferrina

MOPS : ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico

b-mercaptoetanol : 2-hidroxietilmercaptano; 2-mercaptoetanol

Nramp : gen asociado a resistencia a infección por patógenos intracelulares

NTA : N, N - bis [carboximetil] glicina; ácido triglicolámico, nitriloacetato

NP40 : targitol NP40 (nonilfenoxi polietoxi etanol)

OPDD : dihidroxicloruro o-fenilendiamina

PAGE : electroforesis en gel de poliacrilamida

PMSF : fenilmetilsulfonil fluoruro

POPOP : p-bis[2-(5-feniloxazolil)]-benceno

PPO : 2,5-difeniloxazol

Prot : proteína

RET : resistencia eléctrica transepitelial

RITC : rodamina isotiocianato

Rf : coeficiente de migración

RTf : receptor de transferrina

SFB : suero fetal de bovino

SDS : dodecilsulfato de sodio; lauril sulfato

$t_{1/2}$: vida media

t-butOOH : t-butilhidroperóxido

TCA : ácido tricloroacético

Tf : transferrina

Tris : tris (hidroximetil) aminometano

Tween 20 : polioxietilensorbitan monolaurato

1. INTRODUCCIÓN

Importancia del hierro. El hierro (Fe) es un nutriente esencial, a nivel de elemento traza, para la vida de prácticamente todos los organismos vivos. Su presencia es importante para el desarrollo de diversas funciones biológicas, tales como transporte de oxígeno, fijación de nitrógeno, detoxificación y variadas reacciones de fotosíntesis.

Propiedades del Fe. Es un elemento de transición de número atómico 26 y masa atómica 56. Sus 26 electrones se distribuyen en 4 orbitales de la siguiente manera $1s^2$, $2s^2$, $2p^6$, $3s^2$, $3p^6$, $3d^6$ y $4s^2$. El nivel interior incompleto (orbital 3d), el cual permite su clasificación como elemento de transición, presenta 2 electrones apareados y 4 desapareados, esto le permite variar con facilidad su configuración electrónica, así el Fe presenta 2 estados de valencia estables Fe^{2+} y Fe^{3+} , los cuales presentan también electrones desapareados en el orbital 3d. Los electrones desapareados le confieren al Fe y sus iones paramagnetismo, reactividad y afección por otros electrones en busca de alcanzar una configuración electrónica aún más estable. Esta característica le permite al Fe interactuar con un gran número de ligandos y esto a su vez le permite participar en un gran número de reacciones de óxido-reducción con potenciales que van desde los +300 mV a los -500 mV (Wrigglesworth y Baum, 1980). Así, el Fe participa en procesos tan esenciales como la fotosíntesis, la síntesis de DNA, la fosforilación oxidativa (Crichton y Ward, 1992), es parte de enzimas como catalasas, citocromos, hidroperoxidasas, óxido-reductasas, mono y dioxigenasas, liasas, hemoglobina y ribonucleótido reductasas (Wrigglesworth y Baum, 1980).

A pH neutro en medio acuoso, el Fe^{3+} presenta una solubilidad máxima de 10^{-17} M,

ya que el complejo $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ hidroliza y polimeriza rápidamente bajo estas condiciones, sin embargo debido a su alta densidad de carga el Fe^{3+} es un ácido de Lewis fuerte y por lo tanto establece enlaces muy estables con bases de Lewis fuertes como fosfatos, citratos, carbonatos e hidroxilos (May y Williams, 1980). En cambio, el Fe^{2+} , a pH neutro en medio acuoso presenta una solubilidad máxima de 10^{-1} M, dado que su densidad de carga es menor es considerado un ácido de Lewis moderado y por lo tanto establece enlaces con bases de Lewis intermedias como las aminas y los compuestos nitrogenados que presentan oxígenos dadores de electrones (May y Williams, 1980). Su particular configuración electrónica convierte al Fe^{2+} en un reductor, capaz de activar una molécula tan estable como el oxígeno (Wrigglesworth y Baum, 1980), así la interacción $\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2$ genera radicales libres altamente tóxicos en el medio biológico (Wrigglesworth y Baum, 1980).

Debido a la potencial toxicidad del Fe^{2+} y la baja solubilidad del Fe^{3+} , en medios biológicos el Fe se distribuye principalmente asociado a proteínas (60-70 % en hemoglobina, 10 % en mioglobina, citocromos y otras enzimas que contienen Fe y 20-30 % en proteínas de almacenamiento como Ferritina (Fn) y hemosiderina) y su requerimiento en humanos es a nivel de elemento traza, así el hombre y la mujer adultos presentan respectivamente 55 y 45 mg de Fe por kg de peso (May y Williams, 1980), presentando un metabolismo finamente regulado, mediante el cual a diario se absorben desde la dieta 1-2 mg y se excreta (pérdidas obligatorias) igual cantidad de este ión (Crichton y Ward, 1992).

Absorción intestinal de Fe. Diversos estudios demuestran que los enterocitos responden a una baja en los depósitos corporales de Fe incrementando su absorción desde la dieta (Linder y Munro, 1977; Wrigglesworth y Baum, 1980; Muir y col, 1984; Snape y Simpson, 1991). Estas células regulan el balance de Fe de manera tal que altos niveles corporales bloquean y bajos niveles incrementan la absorción intestinal de este ión (Muir y col, 1984; Snape y Simpson, 1991, Linder y Munro, 1977). Por lo tanto, se considera a la absorción intestinal como el paso clave en la regulación de los niveles corporales del Fe (Flanagan, 1989). Para la mayoría de las células humanas, se ha descrito que el mecanismo de incorporación de Fe, es realizado a través de la endocitosis de Tf vía receptores de Tf (RTf) (Romslo, 1980). Los enterocitos en cambio, expresan RTf de forma polarizada en su membrana basal (Parmley y col, 1985; Shah y Shin, 1994), estas células presentan un primer sistema de regulación del contenido de Fe relacionado a la edad de la célula. En la cripta intestinal, las células más jóvenes se ubican en el fondo de la cripta y presentan menor contenido de Fe y Fn, las células más envejecidas se localizan hacia la punta de la cripta desde donde se descaman. De esta forma, al perder las células con mayor contenido de Fe, los enterocitos regulan el contenido de Fe almacenado en el epitelio intestinal. Sin embargo, este proceso no explica la regulación que los enterocitos ejercen sobre la absorción de Fe.

Los mecanismos moleculares involucrados en la regulación ejercida por los enterocitos, no han sido totalmente caracterizados, dada la complejidad del metabolismo del Fe y la heterogeneidad celular, en edad y composición, del epitelio intestinal. Tradicionalmente, el flujo transepitelial del Fe se divide en 3 fases principales: la incorporación de Fe desde el lumen del intestino al interior de la célula; el tránsito

intracelular y la fase de transferencia al plasma (Wheaby y Crosby, 1963). En apoyo al modelo actual (Figura 1), diversas publicaciones proporcionan evidencia de la existencia de un transportador presente en la membrana apical de los enterocitos, el cual sería responsable del proceso de incorporación de Fe desde el lumen intestinal (Muir y col, 1984; Simpson y Peters, 1984; Simpson y col, 1985). Incluso se ha postulado que la incorporación apical es regulada por un transportador de Fe del tipo integrina que ha sido identificado solo funcionalmente (Conrad y col, 1993a, Conrad y Umbreit, 1993b), pero recientemente se ha identificado mediante aislamiento y expresión de ARNm provenientes de intestino de rata un gen que codifica una proteína con actividad de transporte de cationes divalentes (divalent cation transporter, DCT1), el cual sería responsable de al menos parte del transporte de Fe (Gunshin y col, 1997). Estudios de electrofisiología con este transportador, mostraron que corresponde a un transportador acoplado a protón, que transporta otros cationes divalentes como zinc, manganeso, cobalto, cadmio, cobre, níquel y plomo. En humanos se ha determinado la secuencia de un gen homólogo llamado Nramp-2 (Fleming y col, 1997). El gen para Nramp2 fue previamente identificado en humano, y debe su nombre por su similitud con Nramp1 (Gruenheid y col, 1995). Nramp1 es una proteína expresada solo en macrófagos y asociada con la resistencia a infecciones por patógenos intracelulares (Vidal y col, 1993). Ambas proteínas presentan en su secuencia características de transportador (Cellier y col, 1996).

Por otra parte, existen evidencias preliminares que apoyan la Hipótesis de una incorporación apical de Fe por endocitosis de fase fluida (Hughson y Hopkins, 1990). Ambos mecanismos no son excluyentes, ya que el Fe aún internalizado por endocitosis debe cruzar una membrana para alcanzar el citosol (Romslo, 1980). La incorporación apical podría constituir un elemento principal en la regulación de la homeostasis del Fe, ya que experimentos con vesículas derivadas de microvellosidades apicales, muestran que estas vesículas acumulan Fe y además que las vesículas derivadas de animales anémicos presentan una mayor actividad de transporte (Muir y col, 1984).

A nivel intracelular el Fe se encontraría unido principalmente a tres proteínas: mobilferrina (Mf) (Conrad y Umbreit, 1993b), Fn (Crichton y Ward, 1992) y Transferrina plasmática (Tf) incorporada desde el plasma vía receptores de Tf (RTf) presentes en la membrana basolateral (Parmley y col, 1985; Shah y Shin, 1994). La Mf es una proteína con capacidad de unir Fe, presente en el citoplasma de células de la mucosa intestinal (Conrad y col, 1990), presenta homología con calreticulina (Cr) (Conrad y col, 1993c), una proteína de retículo endoplásmico, que une calcio y zinc, que se asocia a integrinas, y es chaperona en el plegamiento de proteínas nacientes (revisado en Michalak y col, 1992; Sontheimer y col, 1995). Mf y Cr coinciden, además, en su peso molecular (56 kDa) y en el punto isoeléctrico (Conrad y col, 1993c), por lo que es posible que sean proteínas con un alto grado de homología pero con una diferente compartimentación celular.

La etapa de transferencia de Fe desde la célula al medio basal es la menos caracterizada. La membrana basolateral de los enterocitos tiene receptores de Tf (RTf) (Diponkar y col, 1986; Hughson y Hopkins, 1990; Parmley y col, 1985; Shah y Shin, 1994), el sistema Tf/RTf tiene una participación muy limitada en la unión de Fe a nivel intracelular (Johnson y col, 1983; Orimo y col, 1994) y su principal función es actuar como

sistema sensor por el cual estas células determinan los niveles de Fe corporal (Nunez y col, 1996).

Un elemento involucrado en la regulación de la absorción intestinal de Fe es HFE, la proteína codificada por el gen de la hemocromatosis hereditaria (Feder y col, 1996). HFE es una proteína integral de membrana perteneciente a la familia del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. interactúa con RTf formando un complejo estable disminuye 10 veces la afinidad de RTf por su ligando (Feder y col, 1998; Lebron y col, 1998). Mutaciones en esta proteína producen una desregulación en la absorción intestinal de Fe, sin embargo se desconoce los mecanismos por los cuales HFE regula la absorción intestinal de Fe.

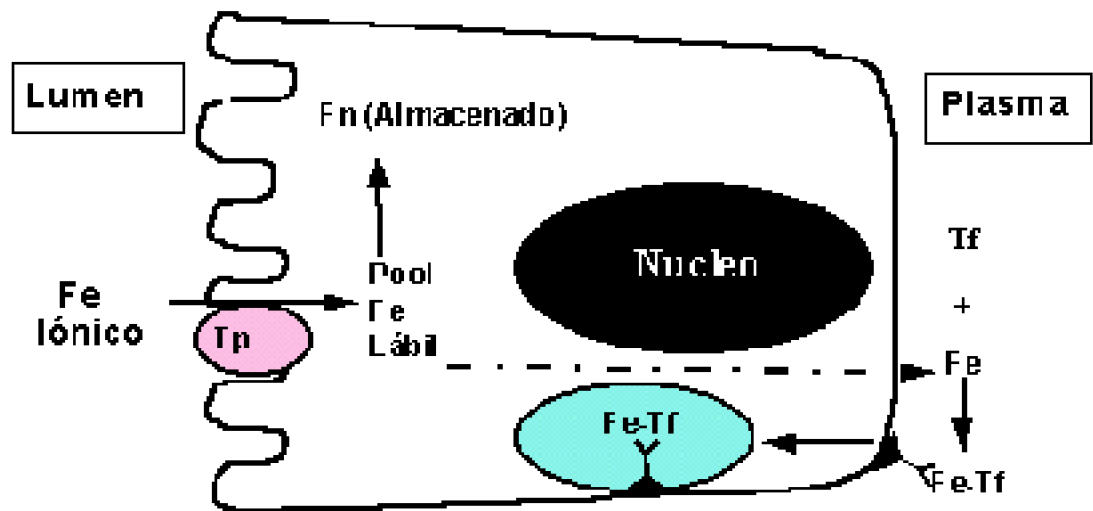


Figura . Modelo de absorción intestinal de hierro iónico.

Tp : Transportador de metales divalentes.

Tf : Transferrina.

Fn : Ferritina.

Almacenaje en Fn. El almacenaje intracelular es un punto crucial en el transporte del Fe, en especial su almacenaje en Fn, ya que corresponde a la principal proteína almacenadora de Fe en casi todas las células en humanos (Crichton y Ward, 1992). Además, actualmente se considera al Fe contenido en Fn plasmática como la presente en las heces un buen indicador del estado de balance de Fe en la célula (Skikne y col, 1995).

La Fn está conformada por un total de 24 subunidades, en su estado libre de Fe (apoFn) presenta un diámetro de 12-13 nm y un peso molecular de 450 kDa. Estudios in vitro han demostrado que la Fn presenta una alta capacidad de unión a Fe^{2+} (hasta 4.500 átomos Fe/molécula), el cual es oxidado a Fe^{3+} , por una actividad ferroxidasa presente en la Fn, previo a ser almacenado como una sal compleja de oxihidroxifosfato (Crichton y Ward, 1992). El proceso de unión de Fe^{2+} a la Fn es susceptible de ser bloqueado por

Zn²⁺ (Niereder, 1970; Harrison, 1996), ya que este ión se une a la entrada de los canales presentes en el oligómero de Fn (vía de incorporación del Fe a esta molécula).

Existen 2 tipos de subunidades de Fn, una de peso molecular 22-24 kDa, denominada tipo H ya que es la subunidad preferencial en la Fn de tejido cardíaco y otra de 20-22 kDa, denominada tipo L (subunidad preferencial en la Fn de tejido hepático), las cuales presentan un 50-55% de homología de secuencia (Crichton y Ward, 1992). Determinaciones de la composición tejido-específica de la Fn, indican que está compuesta por diferentes proporciones de subunidades H y L en distintos tejidos, lo cual le otorga diferentes propiedades de almacenamiento. Así en el hígado la alta proporción de subunidades L le otorgan a la Fn características ácidas y alta capacidad de almacenamiento de Fe (Levi y col, 1994).

Pese a que la Fn es una proteína citosólica, es degradada en compartimentos vesiculados (Cox y col, 1981; Iancu, 1990). Existen además evidencias de que esta proteína sufre autofagia (Hernandez-Yago y col, 1980; Bridges, 1987; Ollinger y Roberg, 1997 y como producto de este proceso genera hemosiderina (Andrews y col, 1987), proteína de aproximadamente 18 kDa, la cual, en estado nativo, presenta baja inmunoreacción con anticuerpos antiFn (Hoy y Jacobs, 1981) y una capacidad de unión de Fe de hasta 2.000 átomos de Fe/molécula (Andrews y col, 1987).

Numerosos trabajos han demostrado que el nivel de Fn correlaciona con los niveles intracelulares de Fe (Linder y Munro, 1977; Niereder, 1970; Harrison y col, 1980) y se ha descrito que la síntesis de Fn es regulada por el contenido intracelular de Fe (Rouault y col, 1989a; Tang y col, 1992; Klausner y col, 1993).

En el modelo de absorción intestinal de Fe actualmente aceptado, el transporte de Fe desde el citosol al espacio basolateral en los enterocitos, estaría regulado por un pool de Fe lábil (Labile Iron Pool, LIP), también llamado Fe de bajo peso molecular o Fe transportable (Flanagan, 1989). Este Fe lábil coexiste con un alto nivel de Fe no disponible para transporte (Fe de alto peso molecular o Fe almacenado). La Fn es en la mayoría de las células del organismo, la principal proteína almacenadora de Fe (Crichton y Ward, 1992), por lo tanto su concentración citosólica podría alterar la relación Fe lábil:Fe almacenado.

Regulación de la síntesis de proteínas involucradas en la homeostasis del Fe. Los niveles de Fe intracelular son finamente regulados: cuando los niveles intracelulares de Fe bajan, se induce la síntesis del RTf (Mullner y col, 1992), este proceso aumenta la incorporación de Fe a la célula por la vía de endocitosis basolateral. Cuando, por el contrario, el suplemento de Fe satisface o excede las necesidades, se incrementa la síntesis de Fn (Rouault y col, 1989^a), con lo que aumenta la capacidad de almacenamiento intracelular de Fe. Esta regulación es llevada a cabo a nivel traduccional por una proteína citoplasmática llamada "Proteína regulada por Fe" (Iron Regulatory Protein, IRP) (Klausner y col, 1993). La IRP se une a un motivo presente en el ARNm del RTf y de Fn denominado elemento de respuesta al Fe (Iron Responsive Element, IRE) (Rouault y col, 1989^a; 1989^b; Haile y col, 1989). El IRE se encuentra en cinco copias en la región 3' no traducida del ARNm del RTf y en una copia en la región 5' no traducida del ARNm de Fn. La unión del IRP a IREs estabiliza el ARNm del RTf, aumentando su expresión, en cambio la unión al ARNm de Fn reprime su traducción (Mullner y col 1992;

Yu y col 1992; Tang y col, 1992). Se ha descrito que IRP tiene actividad aconitasa y gran homología estructural con la aconitasa mitocondrial (Rouault y col, 1991). El IRP tiene un grupo de sulfuro ferroso 4Fe-4S en equilibrio con un ordenamiento 3Fe-4S (Rouault y col 1992). A altas concentraciones de Fe predomina 4Fe-4S, bajo esta conformación, predomina su actividad aconitasa. A bajas concentraciones de Fe, el ordenamiento mayoritario es el 3Fe-4S, predominando la actividad IRP (Haile y col 1992).

De esta manera el Fe influiría sobre su propia homeostasis a través de la regulación de proteínas que participan en su absorción.

Influencia del Fe en el estado de óxido-reducción. Como se dijo antes el Fe, pese a ser un nutriente esencial, representa un alto riesgo de toxicidad para los sistemas celulares (Wrigglesworth y Baum, 1980). El ión Fe^{2+} es capaz de activar al O_2 , molécula que bajo condiciones normales es estable y muy poco reactiva (Wrigglesworth y Baum, 1980). La interacción $Fe^{2+}-O_2$, genera un radical perferrilo ($Fe^{3+}-O_2^-$) de muy corta vida media y alta reactividad (Chance y col, 1979), en este radical la molécula de oxígeno se encuentra en estado de superóxido, el cual por sucesivos procesos reductivos puede generar radicales peróxidos e hidroxilo. A este último tipo de radical libre, se le responsabiliza de iniciar a nivel celular procesos oxidativos que podrían provocar un desbalance en el estado de óxido-reducción e incluso la muerte celular (Chance y col, 1979; Clemens y Waller, 1987).

Las células poseen sistemas que generan y utilizan radicales libres para la realización de procesos tan importantes como la transferencia de electrones (Boveris y Cadenas, 1982; Forman y Boveris, 1982), reacciones inmunológicas (Klebanoff, 1975), síntesis de eicosanoides (Hemler y Lands, 1980) y la detoxificación de xenobióticos (Plaa y Witschi, 1976), entre otras. La célula cuenta con mecanismos de defensa, como las moléculas antioxidantes, entre las cuales el glutatión reducido (GSH) corresponde al principal antioxidante citosólico. GSH participa en la reducción de puentes disulfuro que confieren actividad a una serie de proteínas (ej. Proteínas ferro-sulfuro) (Ishikawa y col, 1986), en el restablecimiento de otros antioxidantes a través de su reducción (ej. Interacción GSH-vitamina E) (McCay y col, 1989), en la detoxificación de xenobióticos (Sies y col, 1980), en la reducción de peróxidos orgánicos a través de la glutatión peroxidasa (GSH-Px) (Ishikawa y col, 1986), esta reacción oxida GSH a GSSG, el cual es reducido nuevamente a GSH por la glutatión reductasa (GSSG-Rd), enzima que oxida NADPH a $NADP^+$ (Chance y col, 1979), finalmente el NADPH es reabastecido por el ciclo de las pentosas fosfato (Chance y col, 1979), por esto la relación GSH/GSSG es considerada como indicadora del estado de óxido-reducción celular. Un segundo mecanismo de defensa antioxidante lo constituyen las enzimas antioxidantes, entre las principales se encuentran la superóxido dismutasa (presente en citosol, mitocondrias, lisosomas, peroxisomas y núcleo de células humanas), catalasa (peroxisomas), glutatión peroxidasa (citosol y mitocondrias) (Chance y col 1979).

Por lo tanto, cuando un estímulo prooxidante, como por ejemplo una sobrecarga de Fe, provoca un desbalance entre la generación de radicales libres y su detoxificación, la célula entra en un proceso degenerativo que puede terminar en su muerte. Pero, por otra parte, innumerables trabajos han proporcionado evidencia de que el estado de óxido-reducción celular afecta también el metabolismo del Fe. Así, el Fe^{3+} debe ser reducido a

Fe^{2+} antes de ser incorporado a la célula (Nunez y col, 1994). El Fe^{2+} es oxidado para ser almacenado en Fn y debe ser reducido para ser movilizado desde esta proteína (Thomas y col, 1985), la síntesis de Fn es inducida por estrés oxidativo (Cairo y col, 1995). En estudios in vitro se ha postulado que una interacción xantina oxidasa-Fn podría dar cuenta de este proceso (Biernacki y col, 1986). Además, recientemente se ha descrito que diversos factores que alteran el estado de óxido-reducción pueden modificar la actividad IRP (Mullner y col, 1992; Meneghini, 1997) y de esta forma alterar tanto la expresión del receptor de Tf, como la traducción de la Fn.

Relación entre el Fe almacenado en Fn y el estado de óxido-reducción. Si la Fn participara de la regulación de la relación Fe lábil:Fe almacenado, los factores que regulan el almacenamiento en Fn también podrían alterar dicha relación. Estudios realizados in vitro indican que, para movilizar el Fe almacenado en la Fn, éste debe ser previamente reducido a Fe^{2+} , lo cual se ha logrado con reductores como el citrato o quelantes de Fe (Thomas y col, 1985). Este punto presenta un interés particular, ya que se ha descrito que una fuerte alteración del estado de óxido-reducción puede estimular la movilización de Fe almacenado (Biernacki y col, 1986), aumentando la proporción del Fe^{2+} lábil y a su vez, el aumento del Fe lábil puede alterar el estado de óxido-reducción celular (Wrigglesworth y Baum, 1980), debido a las características prooxidantes del ión Fe^{2+} , el cual es considerado tóxico a nivel celular.

Células Caco-2 como modelo de epitelio intestinal. Como se dijo antes, para esclarecer los mecanismos que regulan la absorción intestinal de Fe, se requiere de un modelo celular que permita estudiar los aspectos moleculares de su transporte transepitelial, sin interferencias derivadas de la heterogeneidad de los tejidos.

Recientemente, se ha utilizado la línea celular Caco-2 como modelo para el estudio de la absorción de Fe por el epitelio intestinal (Alvarez-Hernández y col, 1991). Estas células son derivadas de un cáncer de colon, presentan inhibición de la proliferación por contacto seguido por un proceso de diferenciación de 12 a 14 días en los que forman monocapas celulares, desarrollan uniones estrechas y polaridad apical/basolateral. Presentan un fenotipo de epitelio intestinal fetal, expresando el transportador de glucosa (Glut-5), presente en epitelio de intestino delgado y ausente en células de intestino grueso y no expresan Glut-4, marcador de colon (Hidalgo y col, 1989). Al ser crecidas en insertos bicamerales, conforman un sistema que posee ventajas notables para el estudio del transporte transepitelial respecto a los sistemas tradicionales, ya que no presentan interferencia de tejidos intersticiales ni musculares. A diferencia de las células del epitelio intestinal, las células Caco-2 en cultivo son homogéneas en edad y contenido de Fe.

Estudios de absorción de Fe realizados en células Caco-2. Los estudios realizados utilizando esta línea celular, han corroborado que corresponde a un excelente modelo de células epiteliales intestinales. Así, Tapia y col (1996), mostraron que mediante un protocolo simple se puede obtener células Caco-2 equilibradas con distintas concentraciones intracelulares de Fe ($[\text{Fe}]_i$). Además al cultivar estas células en insertos bicamerales, regulan tanto la captación de Fe adicionado al espacio apical (Figura 2), como el flujo transepitelial de este ión respecto a la $[\text{Fe}]_i$ (Figura 3).

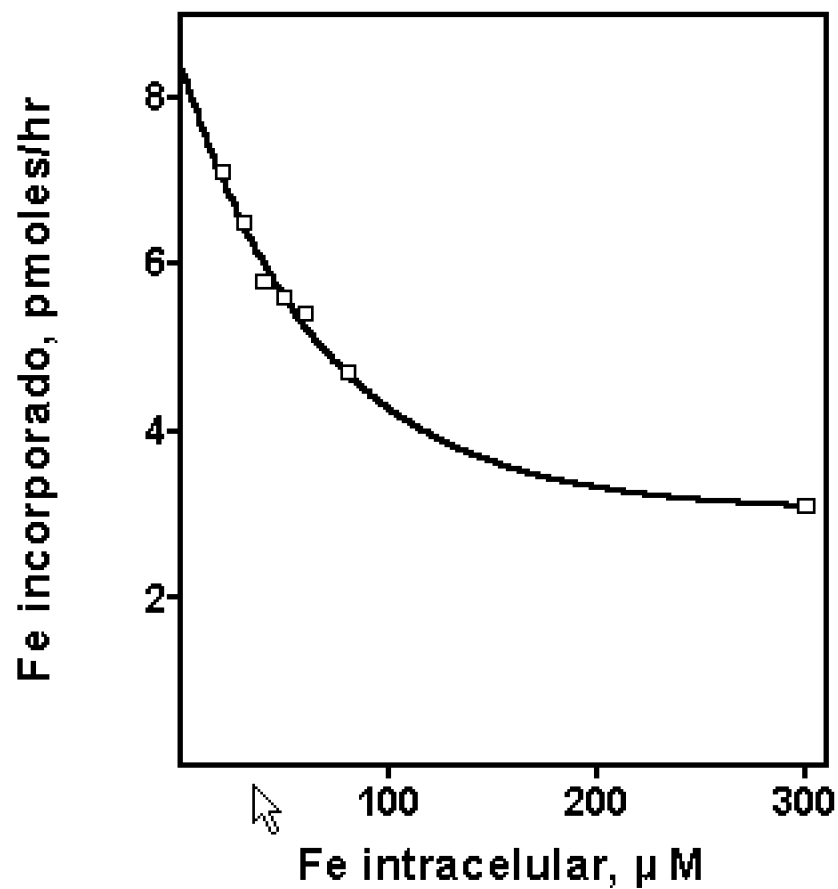


Figura . Regulación de la incorporación de Fe respecto a la $[Fe]_i$. Células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales, regulan la incorporación de Fe de flujo respecto su $[Fe]_i$ (Arredondo y col, 1997). Resultados presentados como pmoles de Fe incorporados por hr en insertos de 6,5 mm de diámetro.

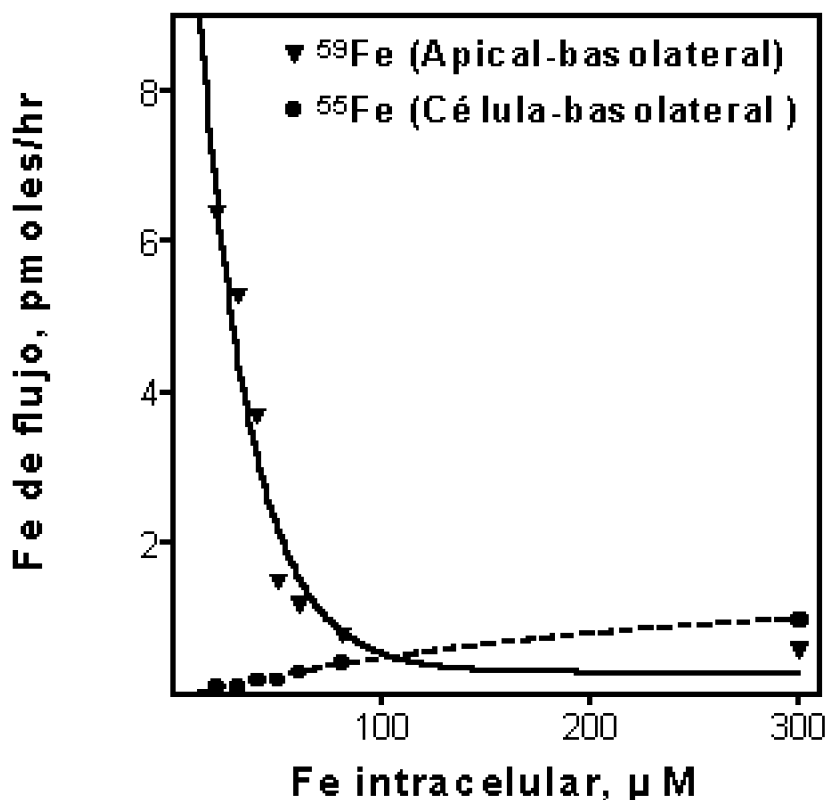


Figura . Regulación del flujo de Fe al espacio basolateral, respecto a la $[Fe]_i$. Células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales, regulan el flujo de Fe al espacio basolateral respecto su $[Fe]_i$ (Arredondo y col, 1997). Resultados presentados como pmoles de Fe transportados al basolateral por hr en insertos de 6,5 mm de diámetro.

Posteriormente, se ha demostrado también que en este modelo celular los niveles de proteínas que participan del flujo y el almacenamiento Fe (RTf y Fn), responden a la $[Fe]_i$ (Arredondo y col, 1997), características que también han sido descritas para los enterocitos. Finalmente, se han proporcionado evidencias de que los niveles de RTf y Fn son mediados por una actividad IRP, presente en estas células, la cual también responde a la $[Fe]_i$ (Arredondo y col, 1997).

NATURALEZA DEL PROBLEMA

El modelo de absorción intestinal de Fe actualmente aceptado, propone que el LIP celular controla la síntesis de proteínas involucradas en la absorción de Fe (Flanagan, 1989). Cuando las células presentan un LIP alto aumenta la síntesis de Fn y disminuye la de RTf (Tapia y col, 1996), en un proceso mediado posiblemente por el sistema IRP/IRE (Arredondo y col, 1997). Por lo tanto, al aumentar el LIP las células intestinales disminuirían la absorción y aumentarían su capacidad de retener Fe (por aumento del

nivel de Fn). Sin embargo, se ha descrito que los enterocitos en estado de anemia absorben gran cantidad de Fe en el flujo vectorial lumen plasma, pero también retienen gran cantidad del Fe absorbido (Johnson y col, 1983; Fairweather-Tait y col, 1985), de esta forma el enterocito adapta su $[Fe]_i$ de manera tal que de cuenta del Fe que el organismo ha incorporado. Lo antes descrito permite preguntarse:

- ¿Por qué células con mayor contenido de Fn, presentan menor retención de Fe?.
- La capacidad de unión de Fe que presenta Fn, ¿puede influir sobre el establecimiento del LIP?.
- La capacidad de unión de Fe que presenta Fn, ¿puede influir sobre el destino del Fe recién incorporado, desviándolo hacia el almacenamiento?.
- Al movilizar el Fe contenido en Fn, ¿aumentaría el LIP o sería transportado al plasma?

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Para responder a las preguntas anteriores, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo: “En células del epitelio intestinal, la Fn regula la absorción de Fe al determinar, por unión del Fe recientemente incorporado, los niveles de Fe transportable al espacio intersticial”

Como hipótesis alternativa se propone que: “Otras proteínas determinan el nivel de Fe transportable. La Fn actúa como un elemento pasivo, uniendo el Fe incorporado desde el lumen del intestino que no fue transportado al espacio intersticial”

OBJETIVOS

Para determinar la validez de la hipótesis planteada se propone como objetivo general “Determinar, utilizando el sistema de células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales, si el nivel intracelular de Fn regula la velocidad de transporte transepitelial, modificando la relación Fe lábil: Fe almacenado o generando un compartimento intracelular de flujo lento para este ión”. Para lo cual se propuso los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1. Determinar si el nivel intracelular de Fn regula la relación Fe lábil:Fe almacenado, modificando de esta manera la velocidad de transporte transepitelial del ión.

Se estudiará si la Fn cumple en este sistema celular su clásico papel de principal proteína almacenadora de Fe, determinando el Fe contenido en Fn a diferentes $[Fe]_i$. Se relacionará el grado de saturación de Fn con la absorción de Fe.

Objetivo específico 2. Determinar si la Fn conforma un compartimento de flujo

lento de Fe respecto a las demás proteínas involucradas en su transporte transepitelial.

Se determinará la incorporación de Fe de flujo a Fn en células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$, se estimará si la Fn constituye un compartimento de flujo lento para el ión. Posteriormente, se intentará bloquear funcionalmente la Fn y se determinará si este proceso altera la absorción del Fe.

Objetivo específico 3. Determinar si el estado de óxido-reducción celular contribuye en el establecimiento de la relación Fe lábil:Fe almacenado movilizando Fe almacenado en Fn o inhibiendo el almacenaje.

Se determinará el estado de óxido-reducción de células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$ y se correlacionará a la absorción de Fe presentada por estas células. Posteriormente, se inducirá un desbalance oxidativo y se estudiará si este proceso moviliza Fe contenido en Fn y/o altera la absorción de este ión.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Reactivos

Sigma-Aldrich Co. : Tris, PBS Dulbecco, DMEM, aminoácidos no esenciales, penicilina/estreptomina, fungizona, NP40, MOPS, ditioneitol, tripsina, b-mercaptoetanol, chelex 100, EDTA, azul de tripán, estándares de peso molecular, HEPES, PMSF, leupeptina, aprotinina, pepstatina A, citocromo C, nicotinamida, antimicina A1, ácido ascórbico, sefarosa activada por BrCN, proteína A, BSA, medio Iscove's, SBF, OPDD, ácido Bórico, PPO, POPOP y Fn humana.

Merck : NaCl, KCl, NaOH, HCl, Na₂HPO₄, K₃PO₄, ZnCl₂, MgCl₂, NaHCO₃, NaCN, glicina, metanol, tween-20, glicerol, acrilamida, bis-acrilamida, ácido acético, alcohol isopropílico, etanol, KH₂PO₄, K₂HPO₄, H₂O₂, H₂SO₄, FeCl₃·6H₂O y Arcopal.

Bio-Rad : SDS, azul de bromofenol, persulfato de amonio, TEMED.

NEN : ⁵⁹FeCl₃, ⁵⁵FeCl₃.

AMERSHAM : ³⁵S-metionina, películas fotográficas Hyperfilm ECL y MPL, Reactivo

Amplify, kit luminiscencia western blot.

2.1.2 Equipos

1. Espectrofotómetro UV-VIS, Perkin Elmer 559.
2. Contador Gamma, Cobra II, Packard.
3. Contador de centelleo líquido Tri-Carb 2100TR.
4. Lector de placas Metertech 960.
5. Medidor Volt-Ohm epitelial, World Precision Instruments.
6. Incubador CO₂-Water Jacketed, Auto Flow, Nuaire.
7. MiniGel Bio Rad, Mini Proteans.
8. Bio-Rad Trans-blot.
9. Secador de geles Gel Dryer, Modelo 583, Bio Rad.
10. Campana de flujo laminar, Nuaire, UN-201-430.
11. Centrífuga Beckman J2-21.
12. Microcentrífuga Eppendorf, SIGMA ISS-112
13. Ultracentrífuga Sorvall Combi OTD.

2.1.3 Material de Cultivo

1. Insertos bicamerales Transwells, con membrana de policarbonato, tamaño de poro de 0,4 µm, 6,5 (Costar 3413) y 24 mm de diámetro (Costar 3412).
2. Insertos bicamerales Transwell-clear, con membrana de poliéster, tamaño de poro de 0,4 µm, 6,5 mm de diámetro (Costar 3470).
3. Frascos de cultivo de 40 ml, área de crecimiento 25 cm², Costar (3025).
4. Placas de cultivo de 6 pocillos, 35 mm de diámetro, (Costar 3406).
5. Placas de cultivo de 24 pocillos, 16 mm de diámetro, (Costar 3424).
6. Tubos plásticos estériles Costar, 15 ml (3316) y 50 ml (3317).
7. Pipetas estériles Costar, 1 ml (4011), 2 ml (4021), 5 ml (4050), 10 ml (4101).
8. Unidades de filtración desechables, tamaño de poro 0,2 µm, Costar, 500 ml (8344) y 1.000 ml (8354).
9. Botellas para medio de cultivo autoclavables, Costar, 500 ml (8393) y 1.000 ml (8396).
10. Placas de Elisa, Nunc Inc.

2.1.4. Material Biológico

2.1.4.1 Células Caco-2 y cultivo celular

La línea celular Caco-2 se obtuvo de la American Type Culture Collection (#HTB 37, Rockville, MD). Estas células pueden cultivarse tanto en botellas de plástico como en insertos bicamerales (Costar, Cambridge, MA). Al cultivarse en insertos (membranas microporosas embebidas en insertos microplatos), exponen su polo apical al compartimento superior el polo basolateral al inferior, permitiendo el estudio de funciones celulares polarizadas y secreción vectorial de proteínas (Figura 4). Las células Caco-2 fueron mantenidas en DMEM, más SBF al 10%, 100.000 unidades internacionales/l de penicilina/estreptomicina, fungizona 25 mg/ml y aminoácidos no esenciales. Se sembraron 5×10^5 células por botellas de 25 ml ó $1,5 \times 10^6$ células por botellas de 75 ml. Se crecieron por 7 días con cambios periódicos de medio a 37°C, 5% de CO₂ (Incubador CO₂-Water Jacketed, Auto Flow, Nuair). Durante este período las células alcanzaron confluencia, obteniéndose entre 4 y 5 millones de células por botellas de 25 ml y entre 10 y 12 millones de células por botellas de 75 ml. Luego las células fueron tripsinizadas y resembradas en iguales condiciones.

2.1.4.2 Anticuerpos

Los anticuerpos policlonales antiFn humana y antiFn humana conjugada a peroxidasa de rábano fueron obtenidos de DAKO (Carpinteria, CA); anticuerpos policlonales antiCr humana fueron obtenidos de Affinity Bioreagents (Golden, CO); anticuerpos policlonales antiTf humana desarrollado en conejo, fueron obtenidos de Calbiochem (La Jolla, CA); AntiIRP humana fueron desarrollados por BIOS Chile, SA; antiRTf humano obtenido de hibridoma OKT9 (ATCC CRL-8021); antiIgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano y antiIgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano fueron obtenidos de Amersham, Life Science.

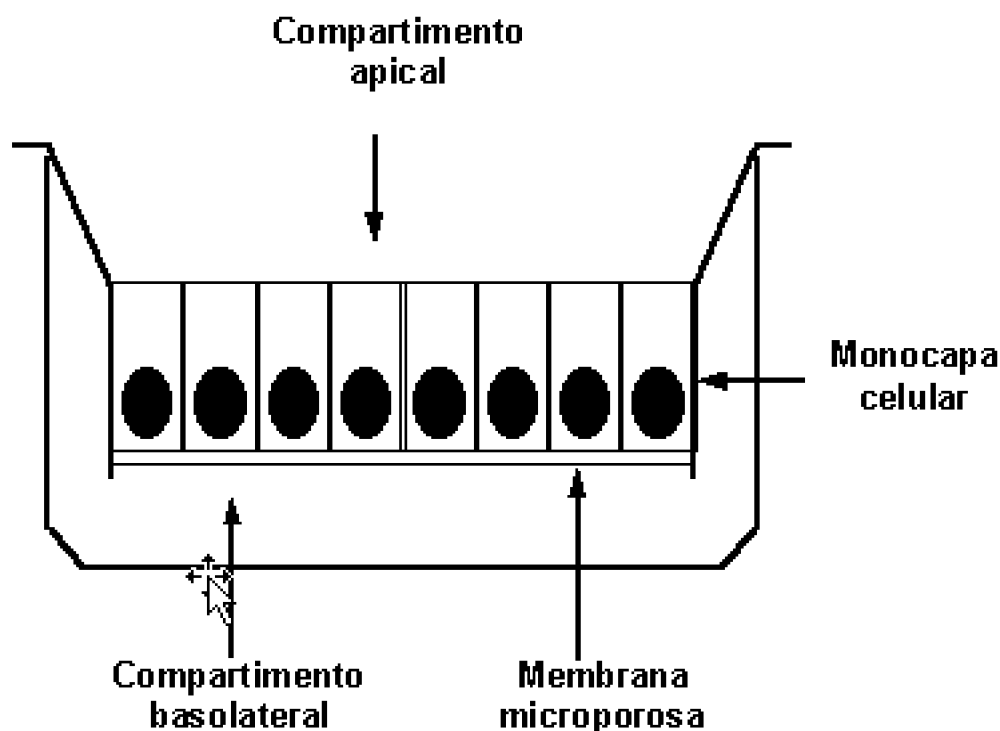


Figura . Esquema del sistema de cultivo en insertos bicamerales. Células Caco-2 son cultivadas a confluencia por 2 semanas en insertos bicamerales. En este sistema las células crecen en forma de monocapa polarizada, desarrollando polos apicales y basolaterales. La formación de la monocapa puede ser medida determinando la RET.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparación de SBF bajo en Fe

El suero de bovino fetal (SBF) bajo en hierro, fue preparado como fue descrito por Alvarez-Hernández y col (1991). Brevemente, se incubó un litro de SBF con 300 g de chelex 100 a pH 4,5 (ajustado con HCl) durante 2 horas a 4°C y agitación constante. Luego se ajustó el pH a 7,4 con NaOH y se incubó durante toda una noche a 4°C con agitación leve, en presencia del chelex. Se esterilizó filtrando el SBF por una membrana Millipore 0,45 μm y luego por Millipore 0,2 μm . La concentración de Fe medida en el suero fue menor a 0,4 μM .

2.2.2 Obtención de células Caco-2 con distinta $[\text{Fe}]_i$

Se realizó como fue descrito por Tapia y col (1996). Brevemente, se sembraron a una densidad de 5×10^5 células Caco-2 / botella de 25 ml en medio Iscove, modificado por Dulbecco sin Fe agregado, suplementado con 10% SBF bajo en Fe y con distintas concentraciones de ^{55}Fe -NTA (relación molar 1:2,2), en un rango entre 0 y $10 \mu\text{M}$ de Fe. Después de 2 pasajes (proliferación a aproximadamente 2×10^6 células/botella/pasaje), las células fueron sembradas en insertos bicamerales de 6,5 ó 24 mm de diámetro (tamaño de poro: $0,4 \mu\text{m}$) a una densidad de 2×10^5 ó 10×10^6 células/inserto respectivamente y se crecieron por 14 días, con cambios periódicos de medio de igual composición determinando la RET con un Volt-Ohmetro EVOM (World Precision Instruments, Sarasota, FI). Se utilizó los insertos que estabilizaron su RET a aproximadamente $800 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$. Para determinar la $[\text{Fe}]_i$ de estas células, se cortó los filtros de los insertos (conteniendo células cultivadas a diferentes concentraciones de Fe) y se determinó su contenido de ^{55}Fe (Contador de centelleo líquido Tri-Carb 2100TR), frente a una curva estándar de ^{55}Fe . Para las células cultivadas en insertos de 6,5 mm el volumen celular fue estimado en $1 \mu\text{l}$, en tanto para las células cultivadas en insertos de 24 mm el volumen celular fue estimado en $13,6 \mu\text{l}$.

2.2.3 Obtención de extractos celulares

Células Caco-2, cultivadas en insertos bicamerales a diferentes $[\text{Fe}]_i$, fueron lisadas incubándolas por 15 min (con agitaciones ocasionales de 20 s) con $50 \mu\text{l}$ por 10^6 células de solución amortiguadora SM-saponina (saponina 0,05 % en solución SM: Sacarosa 0,25 M; MOPS 10 mM pH 7,4; MgCl_2 3 mM; glicerol 5%; DTT 1 mM e inhibidores de proteasas pepstatina A 0,7 mg/ml; aprotinina 0,5 mg/ml; leupeptina 10 mg/ml; PMSF 1 mM). Luego se centrifugaron a $2500 \times g$ por 5 min, se obtuvo así sobrenadantes con bajo contenido de componentes de organelos (ver), los que se almacenaron a -70°C para los estudios posteriores. Para la obtención de extractos celulares totales se realizó el mismo procedimiento utilizando solución amortiguadora SM-Np40 (Np40 0,05 % en solución SM), como fue descrito por Arredondo y col (1997).

Tabla . Enriquecimiento de actividades enzimáticas marcadoras de citosol y organelos en extractos celulares. Las actividades fueron determinadas como fue descrito por Leighton y col (1964) y son expresadas como enriquecimiento (E = Actividad específica en extracto/actividad específica en células permeabilizadas).

Actividad enzimática detectada	SM-saponina (E)	SM-Np40 (E)
LDH	$6,25 \pm 0,833$	$7,13 \pm 0,87$
NADPH cit c reductasa	$0,0089 \pm 0,0007$	$4,53 \pm 0,71$
Cit c Oxidasa	$0,0073 \pm 0,0008$	$5,01 \pm 0,64$
Fosfatasa ácida	$0,045 \pm 0,092$	$6,89 \pm 1,13$
sialil transferasa	$0,053 \pm 0,081$	$6,03 \pm 1,04$

2.2.4 Determinación de Fn por ensayo de ELISA

Los niveles de Fn fueron determinados utilizando la metodología de enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tipo sandwich, descrita por Engrall y Perlman (1971). Brevemente, placas de ELISA de 96 pocillos fueron incubadas toda la noche a temperatura ambiente (o 3 h a 37 °C) con 100 µl por pocillo anticuerpo antiFn humana 0,2 µg/ml, en solución amortiguadora carbonato de sodio 50 mM pH 9,6. Se descartó la solución y se lavó la placa por tres veces con solución amortiguadora PBS-T (Tween 0,05% en solución PBS: NaCl 0,15 M, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, pH 7,4) y se bloqueó la placa con 200 µL por pocillo de solución de bloqueo ELISA por 2 h a 37 °C. Posteriormente, se lavó la placa por tres veces con solución amortiguadora PBS-T y se adicionó muestra (ya sea extractos de células Caco-2 cultivadas a distintas concentraciones de Fe, o las distintas fracciones de las gradientes de sacarosa o de la inmunoprecipitación) diluidas en PBS-T a 100 µl y se incubó 1 h a 37 °C. Se descartó la solución y se lavó la placa por tres veces con solución amortiguadora PBS-T, se adicionó anticuerpo antiFn conjugado a peroxidasa de rábano (100 µl por pocillo), en dilución 1 :20.000 en leche descremada preparada al 5 % en solución amortiguadora PBS-T y se incubó 1 h a 37 °C. Se descartó la solución y se lavó la placa por tres veces con solución amortiguadora PBS-T y se adicionó 100 µL de solución sustrato de peroxidasa (0,25 mg/ml OPDD; 250 ppm de H₂O₂ (30 vol.) en solución fosfato-cítrico: Na₂HPO₄ x 2H₂O 102 mM, ácido cítrico 48 mM) por 30 min, a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo agregando 50 µL por pocillo de H₂SO₄ 25% (v/v). Se leyó la densidad óptica a 492 nm en un lector de placas, Metertech 960, frente a curva estándar de Fn (0,078-10 ng).

2.2.5 Unión de Proteína A a BrCN-sefarosa

Se lavó e hidrató 1 gr de sefarosa activada con bromuro de cianógeno por 15 min en un filtro de vidrio con 200 ml de HCl 1 mM. Se disolvió 10 mg de proteína A en 5 ml de solución amortiguadora pH 8,0 (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl). Se mezcló esta solución con la sefarosa previamente filtrada, y se agitó suavemente con inversión por 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó el material no unido con la solución amortiguadora pH 8,0 y luego se reaccionó cualquier remanente de grupo activo con butilamina 1 M pH 8,0 durante toda la noche. Se realizaron 3 ciclos de lavado, para remover las proteínas unidas no covalentemente, consistentes en un lavado con una solución pH 4,0 (acetato 0,1 M, NaCl 1 M) seguido por un lavado con una solución pH 8,0 (borato 0,1 M, NaCl 1 M). Finalmente se resuspendió en PBS y se le adicionó azida de sodio al 0,02 %. Al momento de usar se lavó 3 veces con solución amortiguadora Tris 1 M pH 8,0.

2.2.6 Determinación del contenido de Fe en Fn

Se realizó por inmunoprecipitación de Fn y determinación del Fe que coprecipita en el proceso. Los extractos celulares, provenientes de células equilibradas a diferentes [Fe]_i, fueron inmunoprecipitados utilizando anticuerpo policlonal contra Fn humana, acoplado a sefarosa activada por BrCN siguiendo las instrucciones del fabricante. Los extractos celulares fueron incubados por 1 h. a 37 °C, con el anticuerpo acoplado a sefarosa, en

solución BSA 0,1 % en PBS-T y posteriormente centrifugados 5 min a 1.000 x g. Luego de 5 ciclos de lavado con PBS-T y precipitación, se determinó el contenido de Fn en el precipitado por ensayo de ELISA y de ^{55}Fe , como fue descrito anteriormente. Se comparó el contenido de Fe en Fn, con el nivel de Fe contenido en proteína, precipitando los extractos celulares con TCA al 10 % final y determinando el ^{55}Fe que coprecipita bajo estas condiciones.

2.2.7 Fraccionamiento subcelular en gradientes continuos de sacarosa

Fue realizado como fue descrito por Leighton y col (1968). Brevemente, los extractos celulares, obtenidos con SM-saponina, fueron cargados al tope de gradientes continuos de sacarosa (20-60 % p/p en 50 mM MOPS-Na, pH 7,5) y centrifugados a 100.000 x g por 1,5 h en una ultracentrífuga Sorvall Combi OTD con un rotor AH-650. Al cabo de este tiempo, los gradientes fueron fraccionados manualmente desde la superficie al fondo, en alícuotas de 100 μl , a las cuales se les determinó contenido de Fe, niveles de Fn y Fe almacenado en Fn como fue descrito antes, actividad de enzimas marcadoras de citosol y organelos, como se describe a continuación.

2.2.8 Determinación de actividades de enzimas marcadoras de organelos

Se determinó actividad LDH como marcador de citosol, NADPH citocromo c reductasa insensible a antimicina A_1 (retículo endoplásmico), citocromo oxidasa (mitocondrias), fosfatasa ácida (lisosomas) como fue descrito por Leighton y col (1968) y actividad sialil transferasa como fue descrito por Deutscher y col (1983).

2.2.9 Electroforesis bajo condiciones no denaturantes

A alícuotas de las fracciones de gradientes o de extractos celulares se les agregó solución de muestra (125 mM tris, 5% glicerol, 0,003% azul de bromofenol, a pH 6,8). Luego se cargaron en un gel de poliacrilamida al 5 %, de Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). El gel se corrió a 100 Volts durante 3 horas en una solución de corrida (192 mM glicina, 25 mM tris, a pH 8,3).

2.2.10 Electroforesis bajo condiciones denaturantes

A alícuotas de las fracciones de gradientes o de extractos celulares se les agregó solución de muestra (125 mM tris, 2% SDS, 1% b-mercaptoetanol, 5% glicerol, 0,003% azul de bromofenol, a pH 6,8) y fueron hervidas por 5 min. Luego se cargaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 8 % ó al 10% (Laemmli, 1970), de Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Como estándares de peso molecular, se usaron

marcadores de pesos moleculares altos (Sigma Markers, Sigma). El gel se corrió a 100 Volts durante 3 horas en una solución de corrida (192 mM glicina, 25 mM tris, 0,1% SDS, a pH 8,3).

2.2.11 Autoradiografía

Alícuotas de extractos celulares o de fracciones de gradientes fueron cargadas en geles no denurantes y luego de ser separadas por electroforesis, los geles fueron embebidos en solución quimioluminiscente (Amplify, Amersham) por 30 min. Finalmente, se realizó una autoradiografía durante 72 horas con una película radiográfica (Hyperfilm MP, Amersham).

2.2.12 Detección de Fn mediante técnica de inmunodetección (Western blot)

La Fn fue detectada mediante inmunodetección tipo Western (Towbin y Gordon, 1984). Las proteínas migradas en geles (en condiciones denurantes o no denurantes), fueron electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa en solución de electrotransferencia (Glicina 0,2 M, Tris 25 mM pH 8,3, metanol 20%, SDS 0,01%), en un Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) a 300 mAmp por 1 hr (Gershoni y Palade, 1982). Una vez transferida las proteínas, la membrana fue incubada con glutaraldehido al 0,2 % en solución TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5) por 45 min y posteriormente en solución de bloqueo de electrotransferencia (leche descremada 5 %, en solución TBS-T: Tween 20 0,2 % en solución amortiguadora TBS), durante la noche a 4°C. Luego la membrana fue lavada 3 veces por 10 min cada lavado, con TBS-T e incubada con anticuerpo antiFn conjugado a peroxidasa de rábano, diluido 1:10.000 en solución de bloqueo de electrotransferencia por 1,5 horas a 37°C. Finalmente la membrana se lavó 3 veces con TBS-T e incubó con la solución sustrato del kit de quimioluminiscencia (Western blot Chemiluminescence Reagent Plus NENTM Life Science Products) en oscuridad y luego fue expuesta por 5 minutos a una película fotográfica (Fuji Medical X-ray Film). Para el revelado y fijación de la película se usaron soluciones comerciales (revelador radiográfico G150 y fijador radiográfico G334, AGFA). La membrana fue posteriormente teñida con solución de Amido Black (Amido black 0,1 %, isopropanol 25 %, ácido acético 10 %) y desteñida en solución isopropanol 25 %, ácido acético 10 %, por 30 min.

2.2.13 Preparación de apoFn

La apoFn fue preparada a partir de un estándar de Fn humana (Sigma-Aldrich), utilizando la metodología descrita por Harrison y col (1980). 100 ng de Fn, fueron dializados contra una solución reductora (acetato de sodio 10 mM pH 4,5; conteniendo ditionito de sodio 50 mM), por 5 hr a 4 °C con agitación constante. Luego de 2 cambios de solución reductora, la apoFn así obtenida se dializó extensivamente contra solución SM.

2.2.14 Preparación de holoFn

La holoFn fue preparada a partir de apoFn, utilizando la metodología descrita por Harrison y col (1980). 50 ng de apoFn, fueron incubados con Fe^{2+} -ascorbato 50 μM en presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 50mM en solución SM, por 2 hr a 37 °C con agitación constante. La holoFn así obtenida se dializó extensivamente contra solución SM.

2.2.15 Inmunolocalización utilizando microscopía confocal

Se cultivó células Caco-2, en insertos bicamerales transparentes (Transwell clear, Costar) a una $[\text{Fe}]_i$ de 270 μM , como fue descrito antes. A los 14 días de cultivo, las células fueron permeabilizadas, con solución SM-saponina por 10 min, lavadas por tres veces con solución SM y fijadas con paraformaldehído al 2 % (este tratamiento elimina la fracción de Fn que se encuentra libre en el citosol). Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con solución SM-Np40 e inmunoreaccionadas con anticuerpo antiFn desarrollado en conejo (dilución 1:1.000, en solución PBS-T con BSA al 0,1 %), por 1 h a 37 °C y se realizó 5 lavados con solución PBS-T. Luego las células fueron incubadas con anticuerpo anti IgG de conejo (fracción IgG) conjugado con RITC (dilución 1:5.000, en solución PBS-T con BSA al 0,1 %), por 1 h a 37 °C y se realizó 5 lavados con solución PBS-T. Finalmente se detectó la fluorescencia asociada a la Fn, en un microscopio confocal, en cortes ópticos de 2 μm .

2.2.16 Determinación de $t_{1/2}$ de Fn

Células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales (24 mm de diámetro) con diferentes $[\text{Fe}]_i$ como fue descrito anteriormente, fueron marcadas metabólicamente con ^{35}S -metionina, en medio DMEM libre de metionina. Luego, las células fueron lavadas con medio DMEM libre de metionina y cisteína por 5 veces e incubadas por diferentes tiempos (1, 3, 18, 24, 48 y 72 h) con el mismo medio al que se le adicionó metionina fría. Se obtuvieron extractos celulares totales (como fue descrito) y se determinó la radiactividad de ^{35}S presente en Fn (Contador de centelleo líquido Tri-Carb 2100TR). De la relación $^{35}\text{S}/\text{ng}$ de Fn respecto al tiempo se determinó la $t_{1/2}$ de la Fn.

2.2.17 Electroelución de proteínas provenientes de geles no denaturantes

Se cargó extractos celulares obtenidos de células a las que se les había sometido a un pulso con ^{59}Fe (como fue descrito antes), en geles no denaturantes al 5 %. Luego de someterlos a electroforesis, se determinó la radiactividad asociada al gel y se cortó las bandas que presentaban alta radioactividad de ^{59}Fe . Estos segmentos fueron puestos en bolsas de diálisis con solución Tris-acetato 50 mM pH 7,4; tioglicolato de Na 0,5 mM y se

electroeluyeron con la misma solución en una cámara vertical a 75 mA por 1 hora a 4°C. El electroeluido se dializó durante la noche a 4°C con 2 cambios contra 1 l de NaHCO₃ 0,1 M; SDS 0,001%.

2.2.18 Inmunodetección de otras proteínas involucradas en la absorción intestinal de Fe

Se realizó según la metodología 'Western' descrita por Towbin y Gordon (1984), utilizando anticuerpos policlonales específicos para cada proteína, antiRTf obtenido del hibridoma OKT9; y los anticuerpos desarrollados en conejo; antiCr, anti Tf y anti IRP.

En el caso de las membranas que fueron incubadas con anticuerpos provenientes de hibridomas, se utilizó como segundo anticuerpo un anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano. Para las membranas que fueron incubadas con anticuerpos provenientes de conejos se utilizó como segundo anticuerpo un anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano. Las condiciones de exposición y revelado fueron similares a las descritas para la inmunodetección de Fn.

2.2.19 Determinación de la absorción de Fe respecto a la [Fe]_i

Se realizó como fue descrito por Tapia y col (1996). Brevemente, las células crecidas por 2 semanas en insertos bicamerales a distintas concentraciones de ⁵⁵Fe, como fue descrito, se les retiró el medio y se agregó medio Iscove's bajo en Fe sin SBF, con 1 mM de ⁵⁹Fe-NTA (1:2,2). Se incubó por diferentes tiempos (30 a 180 min) a 37°C. Se retiró el medio, y se realizó un lavado con EDTA 1 mM en PBS y tres lavados con medio Iscove's sin SBF. Posteriormente, se cortó los filtros y se determinó su contenido de ⁵⁵Fe (Contador de centelleo líquido Tri-Carb 2100TR) y ⁵⁹Fe (Contador Gamma, Cobra II, Packard Instrument, Meriden, CT). De igual manera se determinó el contenido de estos isótopos en el medio basolateral.

2.2.20 Incubación de células con Zn²⁺

Para bloquear la incorporación de ⁵⁹Fe a Fn, las células Caco-2 equilibradas con ⁵⁵Fe, fueron incubadas con ZnCl₂ 2 días antes de realizar los experimentos de absorción de ⁵⁹Fe, específicamente los días 13 y 14 de cultivo en los insertos bicamerales. El ZnCl₂ fue adicionado al doble de la concentración molar del ⁵⁵Fe del cultivo, así, si el medio de cultivo contenía 2,5 μM ⁵⁵Fe-NTA, el ZnCl₂ fue adicionado a una concentración final de 5 μM. El día del experimento, se removió el medio de cultivo y los experimentos de absorción de ⁵⁹Fe, fueron realizados como fue descrito antes para células que no habían sido incubadas con ZnCl₂.

2.2.21 Determinación del estado de óxido-reducción celular

El estado de óxido-reducción celular fue estimado determinando la relación GSH/GSSG. La determinación de GSH fue realizada como fue descrita por Ball (1966). Brevemente, en extractos totales burbujeados con N_2 , se precipitó las proteínas con TCA 10% (concentración final), a continuación se precipitó los tioles totales mediante la adición de ácido glioxílico-ácido ascórbico (1-0,5 g/l en fosfato de potasio 0,5 M, pH 6,8), se incubó a 60 °C por 5 min y luego a 4 °C; bajo estas condiciones GSH permanece en solución con contaminación marginal de otros tioles libres. A continuación, se reacciona el GSH con DTNB (1,5 g/l en fosfato de potasio 0,5 M, pH 6,8) a 25 °C por 5 min. La reacción es determinada como la DO a 412 nm, frente a estándar de GSH.

El GSSG fue determinado como fue descrito por Bernt y Bergmeyer (1984). Brevemente, en extractos totales burbujeados con N_2 , se precipitó las proteínas con TCA 10% (concentración final) y se ajustó a 7,0 el pH del extracto con K_3PO_4 1,75 M. A continuación, se agregó 0,2 unidades de GSSG reductasa (preparada a concentración 20 U/ml en solución sulfato de amonio 3,2 M). Se inició la reacción adicionando NADPH a concentración 0,22 mM. La concentración de GSSG fue estimada a partir del cambio de DO a 340 nm por 5 min, frente a la misma mezcla a la cual no se le adicionó NADPH.

2.2.22 Determinación de actividad GSH-Px

La actividad GSH-Px fue determinada como fue descrito por Paglia y Valentine (1967). Brevemente, 50 μ l de solución GSH 40 mM pH 7,0; fueron combinados con 1 unidad de GSSG reductasa preparada en solución fosfato de potasio 0,25 M, Na_2EDTA 25 mM pH 7,4 y alícuotas de fracciones o muestra, y se ajustó el volumen a 470 μ l con solución KH (NaCl 0,9 %; KCl 0,046 %; KH_2PO_4 0,21 %; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,038 %; $NaHCO_3$ 0,27 %; glucosa 0,09 %). Se incubó la mezcla a 37 °C por 10 min, se agregó 10 μ l de NADPH 20 mM disuelto en $NaHCO_3$ 0,1 %, se agitó e incubó por 2 min a 37 °C. Posteriormente se inició la reacción adicionando 20 μ l de t-butOOH 15 mM y se determinó el cambio de DO a 340 nm por 5 min, frente a la misma mezcla con proteína hervida.

2.2.23 Determinación de actividad GSSG-Rd

La actividad GSSG-Rd fue determinada como fue descrito por Weidemann (1975). Brevemente, 25 μ l de solución GSSG 20 mM; fueron combinados con 250 μ l de solución fosfato de potasio 0,2 M, Na_2EDTA 2 mM pH 7,0 y alícuotas de fracciones o muestra, y se ajustó el volumen a 475 μ l con solución KH_2PO_4 0,1 M; EDTA 1 mM. Se incubó la mezcla a 37 °C por 10 min y se inició la reacción agregando 25 μ l de NADPH 2 mM disuelto en Tris-HCl 10 mM pH 7,0. Se determinó el cambio de DO a 340 nm por 5 min, frente a la misma mezcla con proteína hervida.

2.2.24 Determinación de proteína

Para la estandarización de los resultados obtenidos, utilizando extractos celulares, se

determinó el contenido de proteínas según la metodología descrita por Bradford (1974).

2.2.25 Análisis estadístico

Las variables fueron determinadas en triplicado y la mayoría de los experimentos fueron realizados al menos tres veces. Los gráficos y ajustes fueron realizados utilizando el programa Graphpad Prism (Graphpad Software, Inc., SanDiego, CA). Para determinar las diferencias entre los promedios se utilizó el análisis de Varianza ANOVA y para comparación el análisis t-test post-hoc.

3. RESULTADOS

3.1 Relación contenido de Fn respecto a la $[Fe]_i$, en células intestinales

En primer lugar, con el objetivo de determinar si en el modelo de estudio, el contenido de Fn responde a la $[Fe]_i$, se determinó el contenido de Fn de células Caco-2 cultivadas a diferentes concentraciones de ^{55}Fe . Las células fueron lisadas con solución SM-Np40, se obtuvo de esta manera extractos totales, en los cuales se determinó el contenido de Fn mediante ensayo de ELISA (Figura 5). Como se observa en esta figura, el contenido de Fn aumentó como reflejo del aumento en la $[Fe]_i$. Sin embargo, el aumento de la $[Fe]_i$ fue mayor al aumento en la concentración de Fn. Este resultado sugiere que a $[Fe]_i$ más altos, el grado de saturación de la Fn puede ser mayor, otras proteínas o elementos diferentes a Fn pueden jugar un papel importante en el almacenaje de Fe, o bien puede ser explicado por un aumento del Fe lábil.

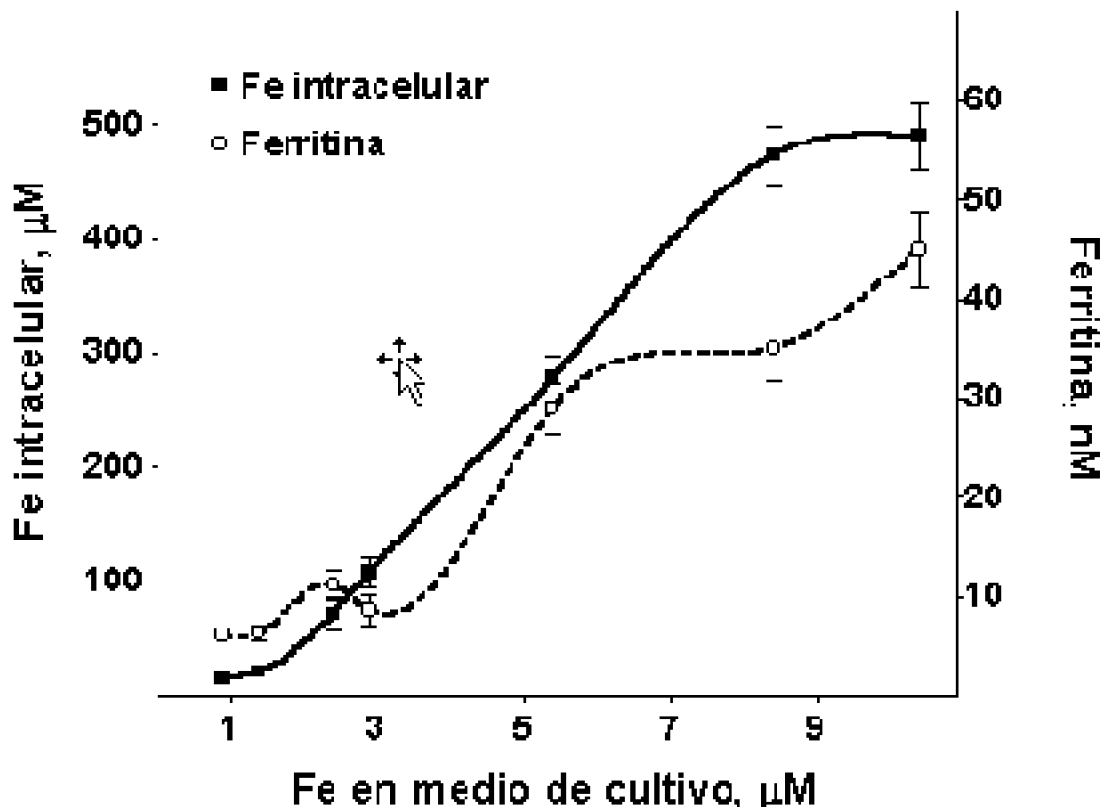


Figura . Relación Fe intracelular y Fn respecto al Fe adicionado al medio de cultivo. A células Caco-2, cultivadas en insertos bicamerales por 14 días a diferentes concentraciones de Fe adicionado al medio de cultivo, se les determinó el contenido de Fe intracelular y de Fn.

3.2 Determinación del Fe contenido en Fn a diferentes $[Fe]_i$

Para estudiar la posibilidad de que al aumentar la $[Fe]_i$, aumente el grado de saturación de la Fn, se determinó el contenido de ^{55}Fe en Fn proveniente de células crecidas a diferentes $[Fe]_i$. Para esto, las células fueron lisadas con solución de lisis SM-saponina, luego de una centrifugación a 1.000 x g, se obtuvo un sobrenadante que corresponde a citosol (con presencia marginal de organelos). En este sobrenadante, se determinó e inmunoprecipitó la Fn, la presencia de Fn celular en estos sobrenadantes, expresada como porcentaje, correspondió a 97, 98, 95, 91 y 77 % a $[Fe]_i$: 16, 21, 75, 103 y 306 μM respectivamente.

Posteriormente se determinó el contenido de Fe en la Fn inmunoprecipitada (Figura 6). En esta figura se muestra el porcentaje de Fe celular que se encuentra contenido en

Fn al realizar la inmunoprecipitación en el citosol. Como se observa, si bien el Fe contenido en Fn aumentó como reflejo del aumento de la $[Fe]_i$ (Figura 6, barras negras), al determinar el porcentaje de Fe contenido en Fn citosólica respecto al total del Fe celular, se observa que dicho porcentaje disminuyó desde un 80 a un 50 %, al aumentar la $[Fe]_i$ desde 16 a 75 μM , sobre esta concentración (75 a 306 μM) el porcentaje de Fe contenido en Fn se mantuvo constante (Figura 6, barras grises).

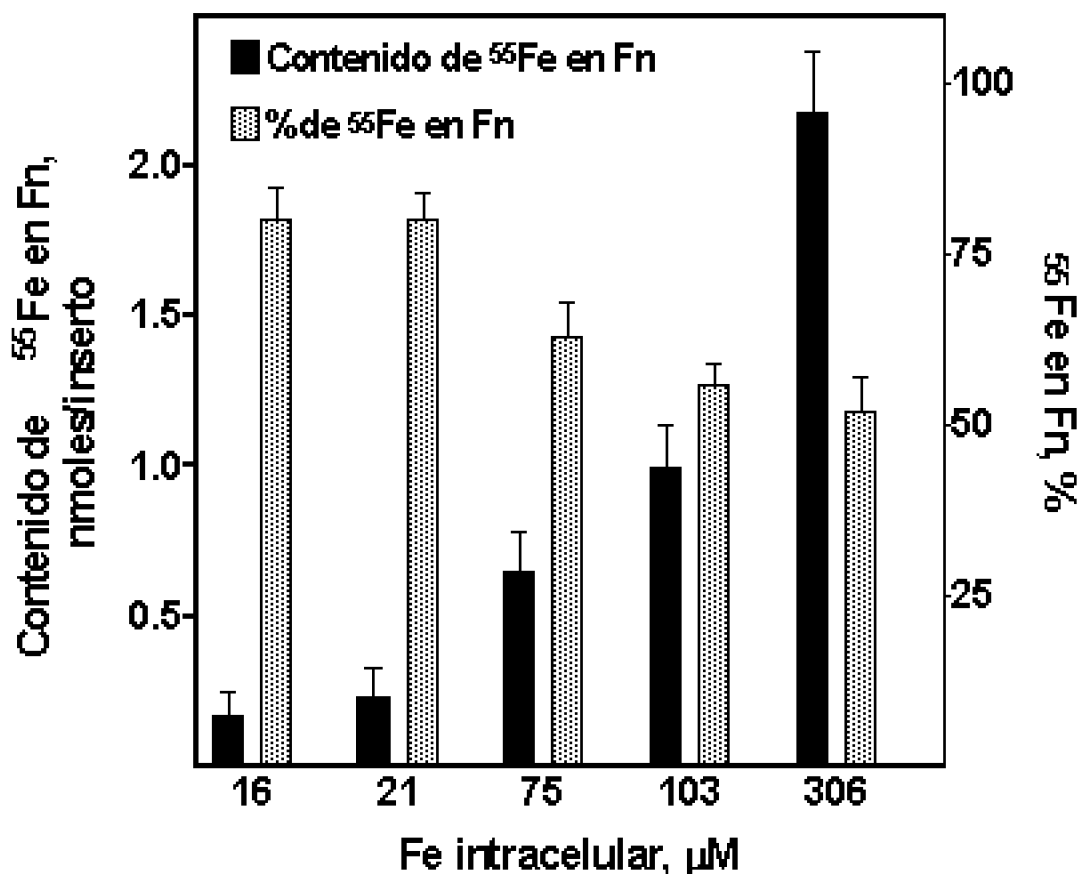


Figura . Determinación de Fe de almacenaje contenido en Fn citosólica. En el sobrenadante obtenido de la lisis, utilizando solución SM-saponina, de células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$, se inmunoprecipitó la Fn y se determinó el ^{55}Fe que coprecipita con ella.

Las barras negras representan el contenido de ^{55}Fe coprecipitado con Fn. Las barras grises representan el porcentaje de ^{55}Fe total presente en Fn.

Se determinó la presencia de Fn en los sedimentos obtenidos del proceso de lisis celular, la cual expresada como porcentaje correspondió a 2,5; 4,8 y 21,3 % a $[Fe]_i$: 75, 103 y 306 μM respectivamente, a $[Fe]_i$: 16 y 21 μM no se obtuvo niveles detectables de Fn en estos sedimentos. A continuación se determinó su contenido de Fe (Figura 7). Para esto, se solubilizó las proteínas presentes en el sedimento utilizando solución SM con Np40 al 0,25 % y se determinó Fe y Fn como fue descrito para el citosol. Como se observa en esta figura, al aumentar la $[Fe]_i$, aumentó la presencia, en el sedimento, de una población de Fn insoluble en solución SM-saponina, la cual presentó un contenido de

Fe especialmente notable sobre $[Fe]_i$, 75 μM (16 a 29 % del ^{55}Fe total en el rango de $[Fe]_i$, 75 a 306 μM). Si se considera esta población de Fn y su contenido de Fe en el balance global de Fe en Fn, se encuentra que a cualquier $[Fe]_i$ estudiada el Fe contenido en Fn correspondió aproximadamente al 80 % del total de Fe celular. Considerando que el Fe contenido en proteína es aproximadamente un 90 % del total de Fe celular a cualquier $[Fe]_i$ estudiada (no mostrado), los resultados presentados en las figuras 6 y 7 indican que la Fn responde a la $[Fe]_i$ y es el principal elemento celular de almacenaje de este ión.

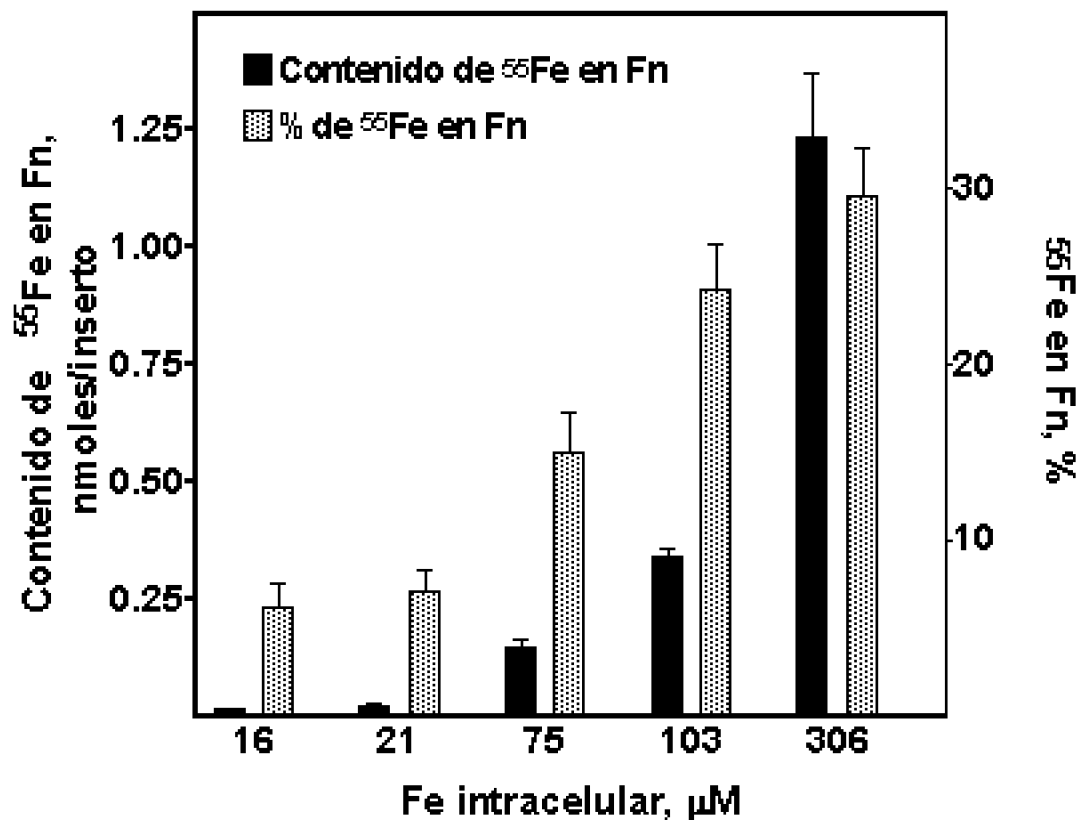


Figura . Determinación de Fe de almacenaje contenido en Fn no citosólica. En el sedimento obtenido de la lisis, utilizando solución SM-saponina, de células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$, se inmunoprecipitó la Fn y se determinó el ^{55}Fe que coprecipita con ella. Las barras negras representan el contenido de ^{55}Fe coprecipitado con Fn. Las barras grises representan el porcentaje de ^{55}Fe total presente en Fn.

3.3 Determinación de la localización subcelular de la Fn

Se ha descrito a la Fn como una proteína citosólica, sin embargo bajo condiciones de

sobrecarga de Fe, se ha reportado que esta proteína se encuentra asociada a compartimentos vesiculados (Selden y col 1980, Richter, 1984). Con el objetivo de determinar la localización de la Fn y el Fe celular, se obtuvieron extractos citosólicos (utilizando para la lisis celular la solución SM-saponina), de células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$ (16, 75 y 270 μM). Estos extractos fueron cargados al tope de gradientes continuos de sacarosa (20-60 % p/p), centrifugados y fraccionados como fue descrito en métodos. En las fracciones obtenidas, se determinó el contenido de Fn y ^{55}Fe (Figura 8). En esta figura se observa un patrón discreto de Fe (fracciones de densidad 1,10-1,15 g/ml), en tanto la Fn presentó un patrón que sugiere distintas poblaciones de esta molécula. Algunas fracciones de baja densidad, presentaron alto contenido de Fn, pero escaso contenido de Fe de almacenaje, en tanto otras fracciones de densidad más alta (1,10-1,16 g/ml), presentaron un contenido alto tanto de Fe, como de Fn. Esta última población de Fn, respondió al aumento de la $[Fe]_i$.

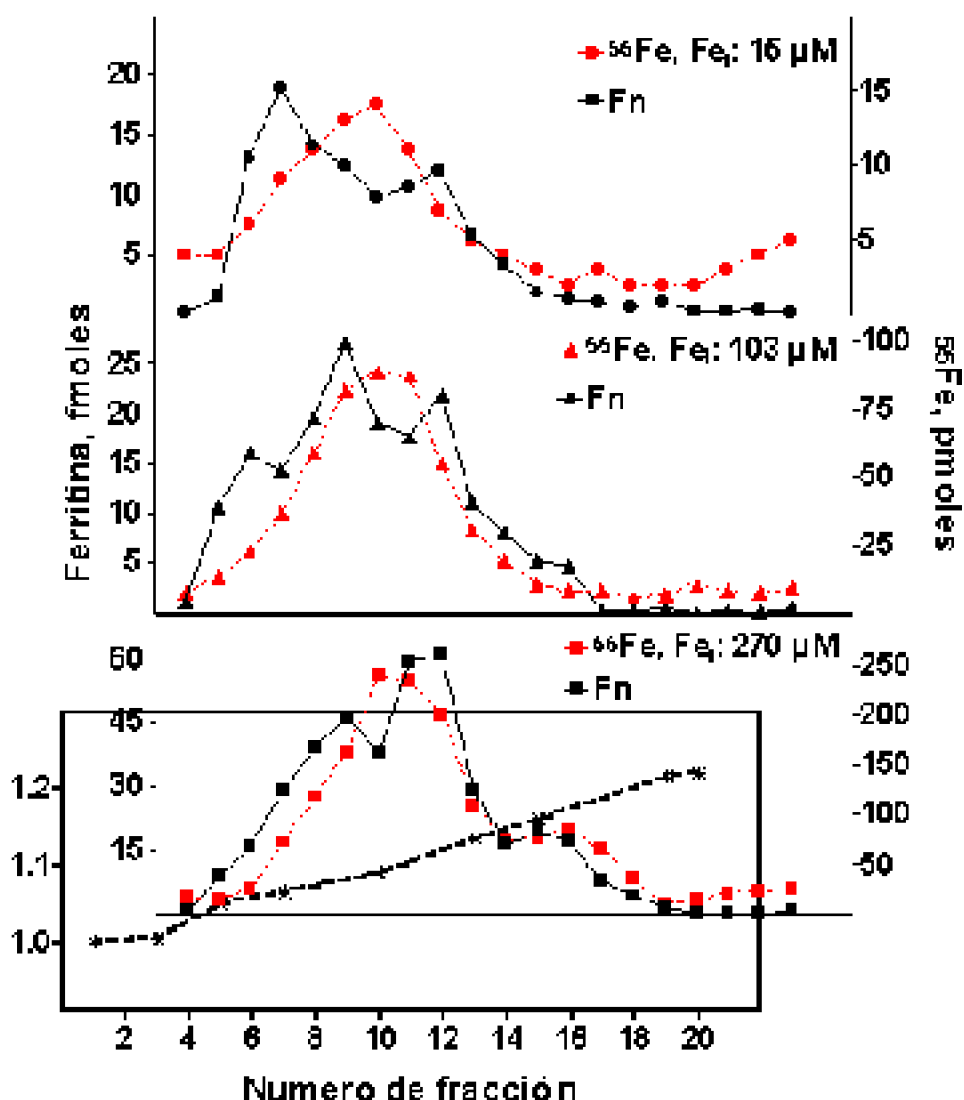


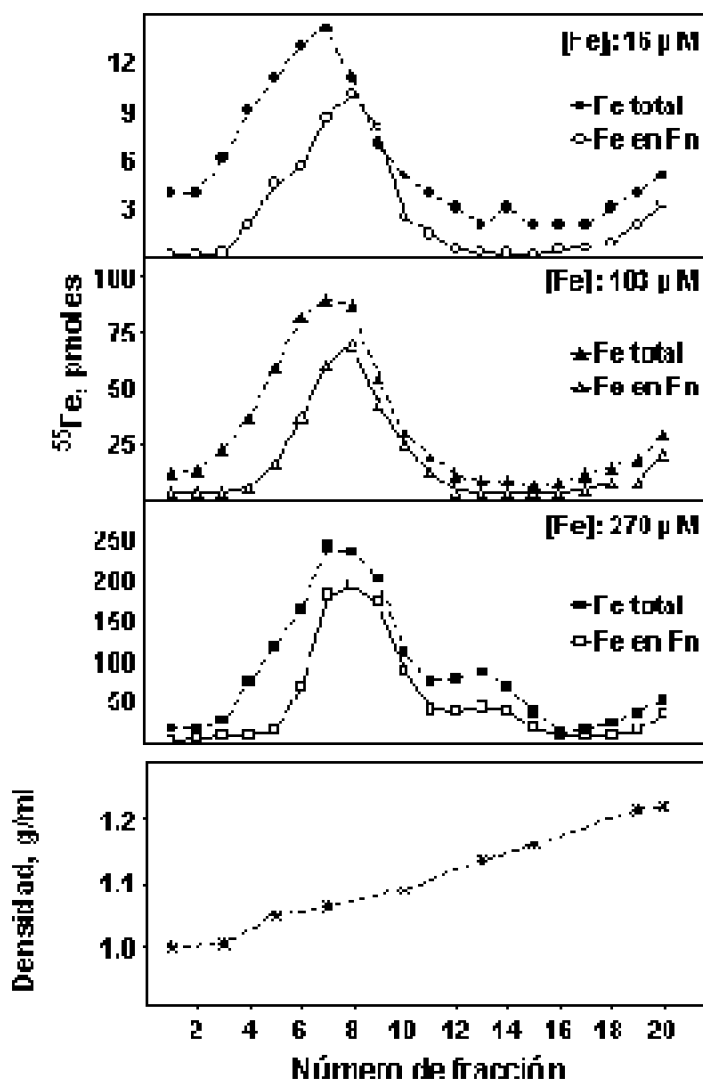
Figura . Fraccionamiento isopícnico de ^{55}Fe y Fn presentes en extractos de células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$.

Extractos de células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$, fueron fraccionados en gradientes continuos de sacarosa (20-60 % p/p). En alícuotas de cada fracción se determinó el contenido de Fn, mediante ensayo de ELISA y la radioactividad asociada a ^{55}Fe .

Se determinó a continuación, en las fracciones antes descritas, si la Fn que cofracciona con el Fe de almacenaje, contiene una alta proporción de este ión. Para esto, se inmunoprecipitó la Fn, en alícuotas de cada una de las fracciones antes descritas y se determinó el Fe que coprecipita con esta molécula (Figura 9). Se observa que al inmunoprecipitar la Fn presente en fracciones de alta densidad (1,10-1,16 g/ml), coprecipitó una alta proporción del Fe de almacenaje. Este resultado fue corroborado determinando el Fe y la Fn en el sobrenadante obtenido en este proceso (no mostrado). Por otra parte, la población de Fn de baja densidad, presentó escaso contenido de Fe de almacenaje.

Figura . Fraccionamiento isopícnico del Fe almacenado en Fn. Extractos de células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$, fueron fraccionados en gradientes continuos de sacarosa (20-60 % p/p). En alícuotas de cada fracción se inmunoprecipitó la Fn y se determinó la radioactividad asociada a ^{55}Fe en los precipitados (Fe en Fn, símbolos blancos) y en fracciones tratadas de igual forma pero sin adicionar α -Fn (Fe total, símbolos negros).

Panel inferior: patrón de densidad de la gradiente utilizada.



3.4 Grado de saturación de poblaciones de Fn que presentan diferente localización subcelular

Sobre la base de los resultados antes descritos, se calculó la relación: átomos de Fe/molécula de Fn para cada $[Fe]_i$ estudiada (ρ).

Como se observa en esta tabla, la Fn presente en fracciones de baja densidad, presentó baja saturación de Fe a cualquier $[Fe]_i$, en tanto en la Fn presente en fracciones de densidad 1,06-1,10 g/ml, la relación átomos de Fe/molécula de Fn aumentó desde aproximadamente 830 a 3600 al aumentar la $[Fe]_i$, desde 16 μM a 270 μM . La población de Fn presente en fracciones de densidad 1,12-1,16 g/ml, presentó un alto contenido de Fe solo a $[Fe]_i: 270 \mu M$.

Tabla . Relación átomos de Fe / molécula de Fn. Extractos de células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$, fueron fraccionados en gradiente continuo de sacarosa. Las fracciones obtenidas fueron inmunoprecipitadas con aFn unida a sefarosa. En el precipitado se determinó el contenido de ^{55}Fe y Fn. Los resultados son presentados como el promedio de 4 determinaciones \pm DE.

	1,00-1,05 g/ml	1,06-1,10 g/ml	1,12-1,16 g/ml
$[Fe]_i$, μM	Relación : átomos de Fe / molécula de Fn		
16	62 \pm 7	827 \pm 67	251 \pm 37
103	271 \pm 28	3025 \pm 124	655 \pm 58
270	424 \pm 59	3616 \pm 113	2158 \pm 102

3.5 Determinación de la capacidad de almacenaje de Fe de la Fn. Uso de geles nativos

Para descartar la posibilidad que el proceso de inmunoprecipitación pueda alterar la capacidad de almacenaje de Fe en Fn, se cargó alícuotas de fracciones, obtenidas de extractos celulares provenientes de células con $[Fe]_i$:270 μM (las cuales presentan todas las poblaciones de Fn antes descritas), en geles nativos al 5 % acrilamida, y se determinó el ^{55}Fe por autoradiografía (Figura 10, panel medio) y la Fn por transferencia a membranas de nitrocelulosa y posterior inmunodetección (Figura 10, panel inferior). Como se observa en el panel inferior de esta figura, se detectó Fn en fracciones de densidad que abarcan un rango amplio (1,00-1,16 g /ml), pero solo los oligómeros presentes a alta densidad (1,10-1,16 g /ml), comigraron en el gel con señales fuertes asociadas a radioactividad de ^{55}Fe , concordante con la alta capacidad de almacenaje de Fe mostrado por la Fn presente en estas fracciones en los resultados anteriores. Es interesante notar que las fracciones de densidad 1,13-1,16 g /ml, presentaron señales de autoradiografía fuertes a un Rf que corresponde a la migración de Fn oligomérica. Sin embargo, la reacción de inmunodetección de Fn en estas fracciones fue débil.

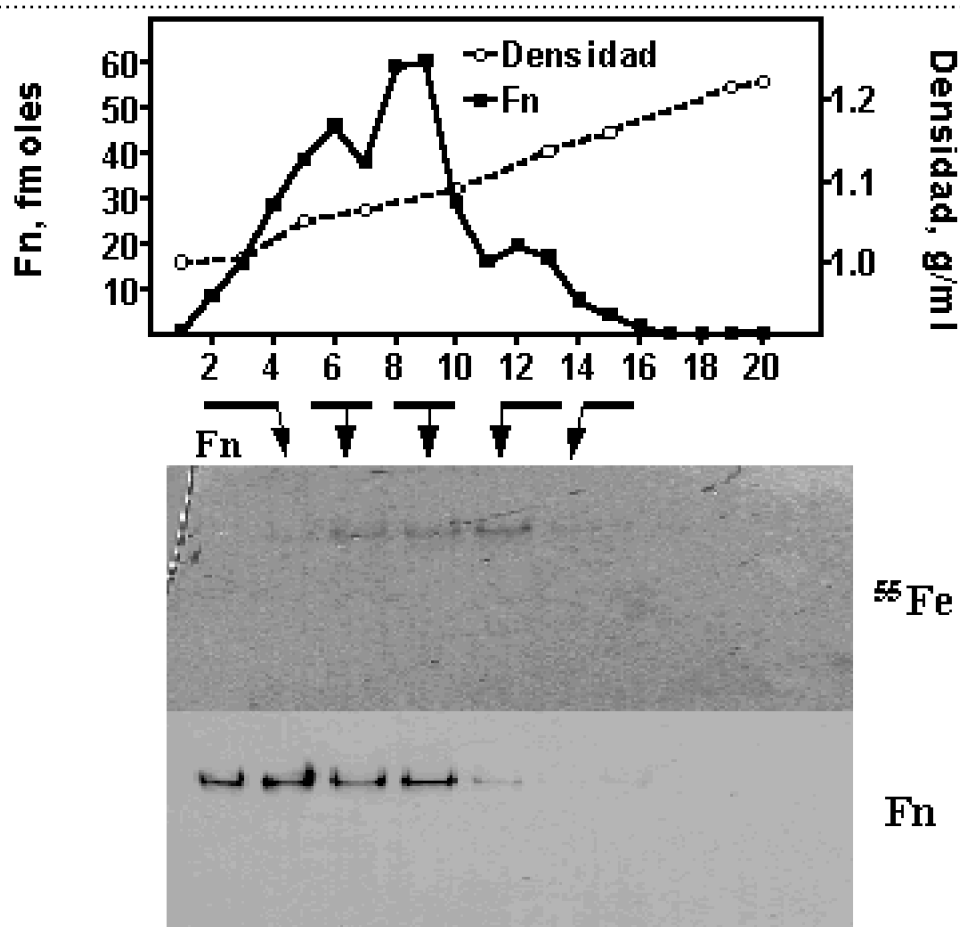


Figura . Determinación en gel nativo del ^{55}Fe y Fn presentes en un extracto, obtenido con solución SM-saponina, fraccionado isopícnicamente. Extractos de Células Caco-2 cultivadas a $[\text{Fe}]_i$: $270 \mu\text{M}$, fueron fraccionados en gradiente continuo de sacarosa. Alícuotas de las fracciones obtenidas, fueron migradas en gel nativo y sometidas a autoradiografía (panel medio), un gel gemelo fue transferido a nitrocelulosa y se inmunodetectó Fn (panel inferior).

3.6 Determinación de la composición de subunidades de los oligómeros de Fn. Uso de geles denaturantes

Se ha descrito que la proporción de subunidades H y L de los oligómeros de Fn, influye sobre su capacidad de almacenaje de Fe (Levi y col, 1994), por lo tanto se estudió la conformación de las diferentes poblaciones de Fn presentadas en la. Para esto, se aislaron las bandas que dieron señal positiva para Fn, desde la membrana de nitrocelulosa. Estas bandas fueron incubadas a 100°C en solución de muestra con SDS y β -mercaptoetanol, a continuación se cargaron en un gel al 10 % de acrilamida y se migró la proteína por electroforesis bajo condiciones denaturantes. Posteriormente, la

proteína fue transferida a membrana de nitrocelulosa y se realizó inmunodetección de Fn para determinar la proporción de subunidades H y L (Figura 11). Los resultados presentados en esta figura, muestran que en las fracciones de densidad 1,00 a 1,10 g/ml, la Fn presentó una señal principal de 23 kDa. En tanto, en el rango de densidades 1,13-1,16 g/ml, se observó señales de 23 y 18 kDa, en una proporción aproximada de 1:1.

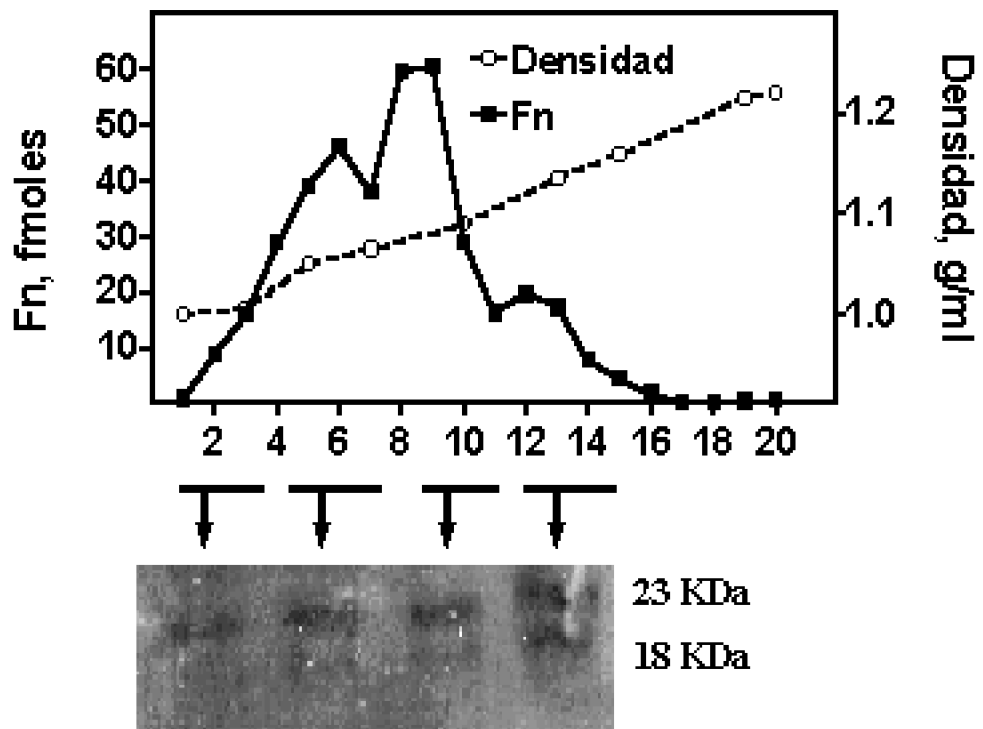


Figura . Composición de las ferritinas separadas mediante fraccionamiento isopícnico. Extractos de Células Caco-2 cultivadas a $[Fe]_i$: 270 μM , fueron fraccionados en gradiente continuo de sacarosa. Alícuotas de las fracciones obtenidas, fueron migradas en gel acrilamida al 10% bajo condiciones denaturantes. Las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa y se inmunodetectó la Fn (panel inferior).

3.7 Determinación del cambio de densidad de fraccionamiento de la Fn frente a la adición de detergente Np40, previo al fraccionamiento

La alta densidad de fraccionamiento de la población de Fn que presenta alta capacidad de almacenaje de Fe, sugirió que ella podría encontrarse en compartimentos vesiculados. Por lo tanto, se determinó si la Fn y/o el Fe que ella contiene, presentaba cambio de densidad de fraccionamiento al adicionar a los extractos celulares, obtenidos con tampón

SM-saponina, detergente Np40 al 0,1%, 15 min antes de realizar el fraccionamiento. Los resultados de este tratamiento se resumen en la Figura 12. Como se observa en esta figura, tanto la Fn, como el Fe que fracciona a densidades 1,13-1,16 g/ml, disminuyó al tratar los extractos con Np40, y al mismo tiempo aumentó su presencia al fondo de la gradiente. Por otra parte, tanto la Fn como el Fe presente en fracciones de densidades 1,00 a 1,12 g/ml no presentaron sensibilidad a la adición del detergente. Dado que la Fn presente en fracciones 1,00 a 1,12 g/ml, no presentó sensibilidad a la adición de detergentes, el rango de densidades a las cuales fraccionó podría ser debida al contenido de Fe que presenta. Para estudiar esta posibilidad se determinó la densidad de fraccionamiento en gradiente continuo de sacarosa (20-60 % p/p), de un estándar de apoFn y Fn cargada con Fe (Figura 13). Como se observa en esta figura, la apoFn fraccionó a densidades de 1,00 a 1,05 g/ml, en tanto la Fn cargada con Fe fraccionó en un rango más amplio (1,03 a 1,10 g/ml), lo cual sugiere que las poblaciones de Fn que fraccionan a densidades 1,00 - 1,12 g/ml, se encontrarían libres en el citosol y presentarían diferente saturación de Fe.

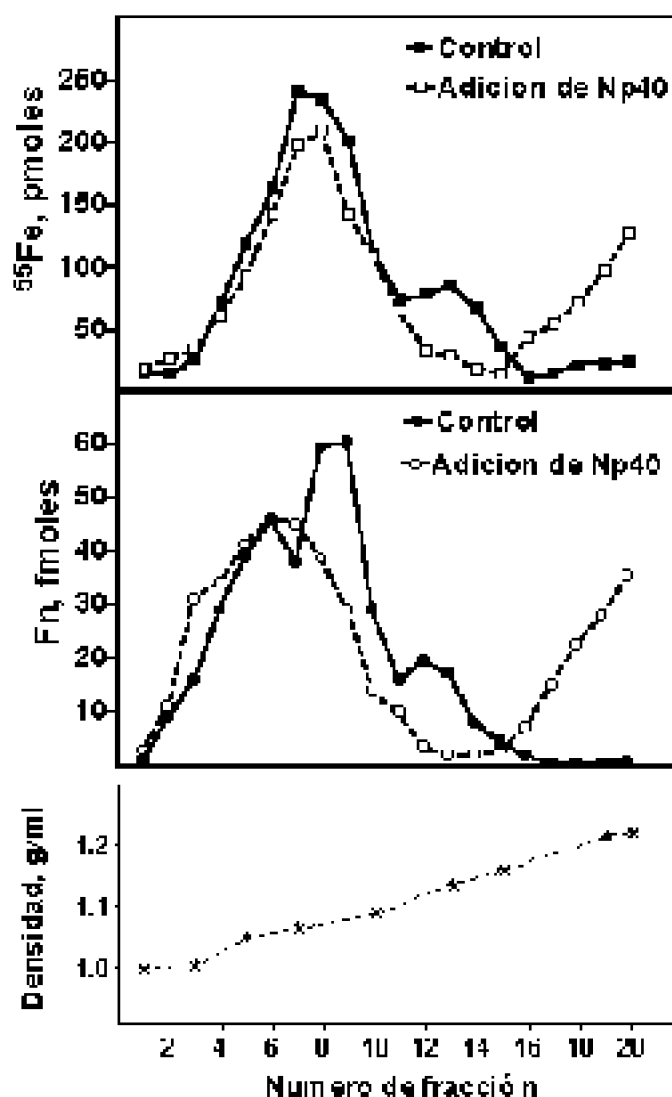


Figura . Cambio de densidad de equilibrio de la Fn frente a la adición de detergente Np40, previo al fraccionamiento. Extractos de células cultivadas a $[Fe]_i$: 270 μM , obtenidos con tampón SM-saponina, fueron tratados con detergente Np40 al 0,1% por 15 min. Los extractos tratados con Np40 fueron fraccionados en gradiente continuo de sacarosa, frente a extractos controles. A las fracciones obtenidas se les determinó el contenido de ^{55}Fe (panel superior) y Fn (panel medio). **Panel inferior : patrón de densidad de la gradiente utilizada.**

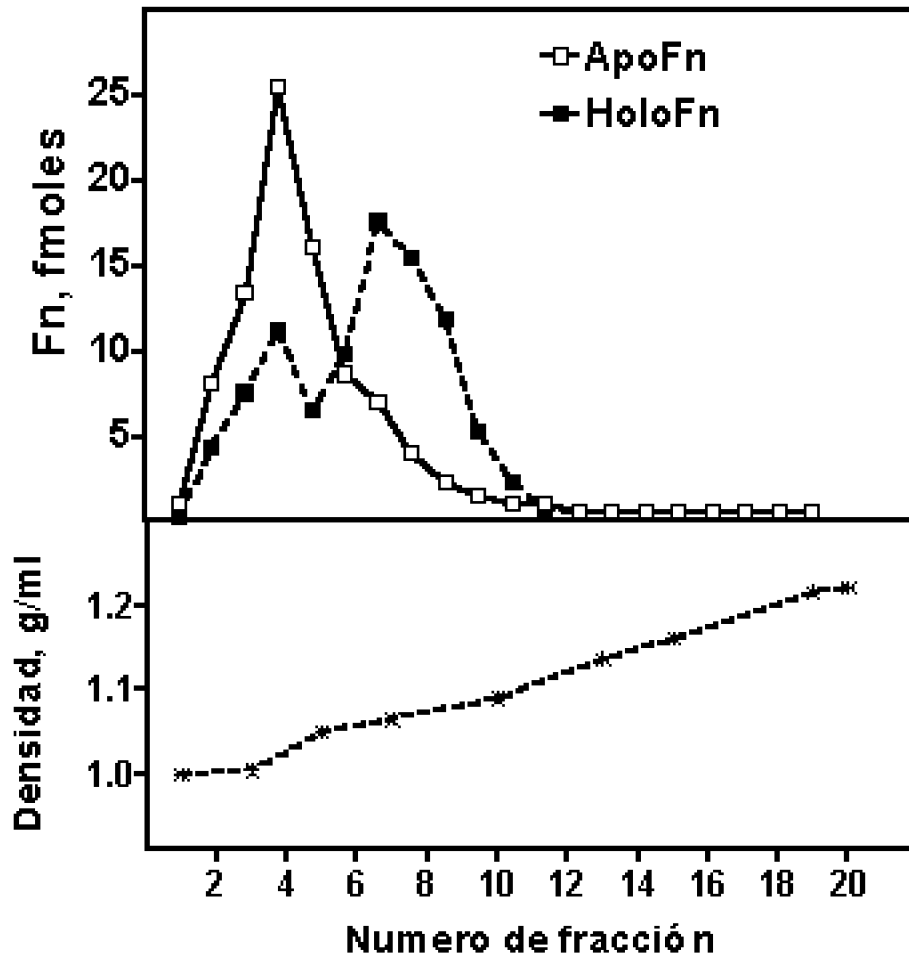


Figura . Fraccionamiento isopícnico de un estándar de apoFn y de holoFn. Panel superior: un estándar de Fn fue depletado de Fe como fue descrito en métodos. La apoFn así obtenida fue fraccionada en gradiente continuo de sacarosa (20-60 % p/p), frente a un estándar de Fn cargado con Fe (HoloFn). La densidad de estos estándares no varió al adicionar detergente Np40 (no mostrado). Panel inferior: patrón de densidad de la gradiente utilizada.

3.8 Distribución subcelular de la Fn vesiculada.

Microscopía confocal

Si alguna población de Fn se encuentra en compartimentos vesiculados, ella debería presentar una distribución discreta, al determinar esta molécula utilizando microscopía confocal. Por lo tanto, se cultivó células Caco-2 a $[Fe]_i$: 270 μ M, en filtros transparentes de 6,5 mm y se estudió la localización de Fn por microscopía confocal (Figura 14). En esta figura se observa el resultado obtenido al permeabilizar las células con solución SM-saponina y lavar extensivamente previo a la fijación con paraformaldehído e inmunodetección (como fue descrito en Materiales y Métodos). Se presentan cortes ópticos de 2 μ m, que van desde el filtro (izquierda superior del panel superior), a la zona supranuclear (derecha inferior panel superior). La señal de fluorescencia obtenida, corresponde a Fn presente en compartimentos no permeabilizables por saponina. Al realizar la integración ortogonal de los cortes ópticos del panel superior (panel inferior), se observa que la señal de Fn se distribuyó en compartimentos perinucleares, alcanzando incluso al supranuclear, sin embargo cuando el experimento se realiza eliminando la incubación con la solución que contiene Np40 (SM-Np40), no se detectó señal de Fn (no mostrado). Por el contrario, al realizar la inmunodetección permeabilizando las células directamente con la solución SM-Np40 se observó un patrón difuso de la señal de Fn desde el polo basolateral al apical (no mostrado). Por lo tanto, el patrón de Fn aquí descrito corresponde a Fn presente en el interior de un compartimento no permeabilizable por saponina. Al aumentar la resolución de la integración ortogonal de la Figura 14, para observar la distribución de Fn en una célula (Figura 15), se observa un patrón discreto de la señal de Fn. Como se observa en esta figura, la Fn se localizó en compartimentos perinucleares, alcanzando también el espacio supranuclear, pero no la zona basal, como tampoco el apical. La distribución de la señal de Fn presentó un aspecto de trabécula.

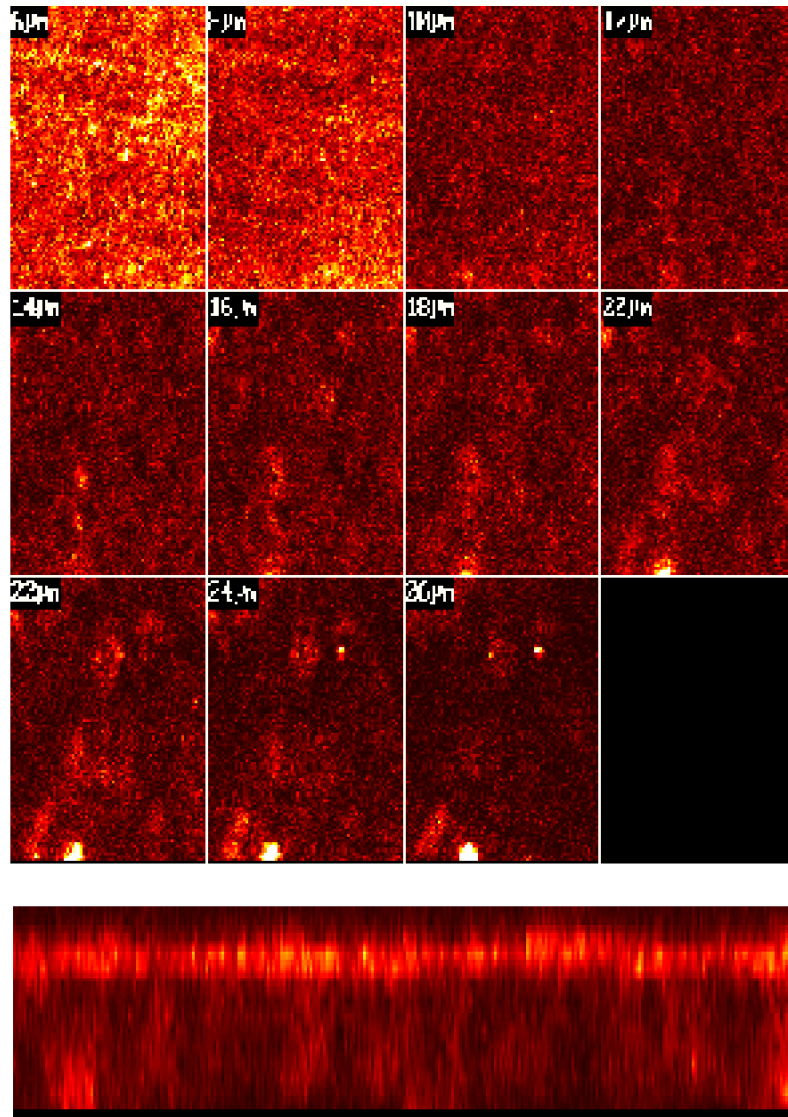


Figura 14. Inmunolocalización de Fn, utilizando microscopía confocal.

a) Cortes ópticos.

Células Caco-2 cultivadas a $[Fe]_i$: 270 μM , en insertos transparentes, fueron depletadas de Fn citosólica mediante lisis con solución SM-saponina y lavado extensivo. Las células fueron fijadas con paraformaldehído y se permeabilizó sus membranas internas con solución SM-Np40. Se muestran cortes ópticos virtuales de 2 μm , desde el filtro (superior izquierda) hasta la zona supranuclear (fondo derecha).

b) Secciones ortogonales. Los resultados anteriores, fueron integrados en el eje z, para dar una visión de la distribución de la Fn desde basolateral al supranuclear.

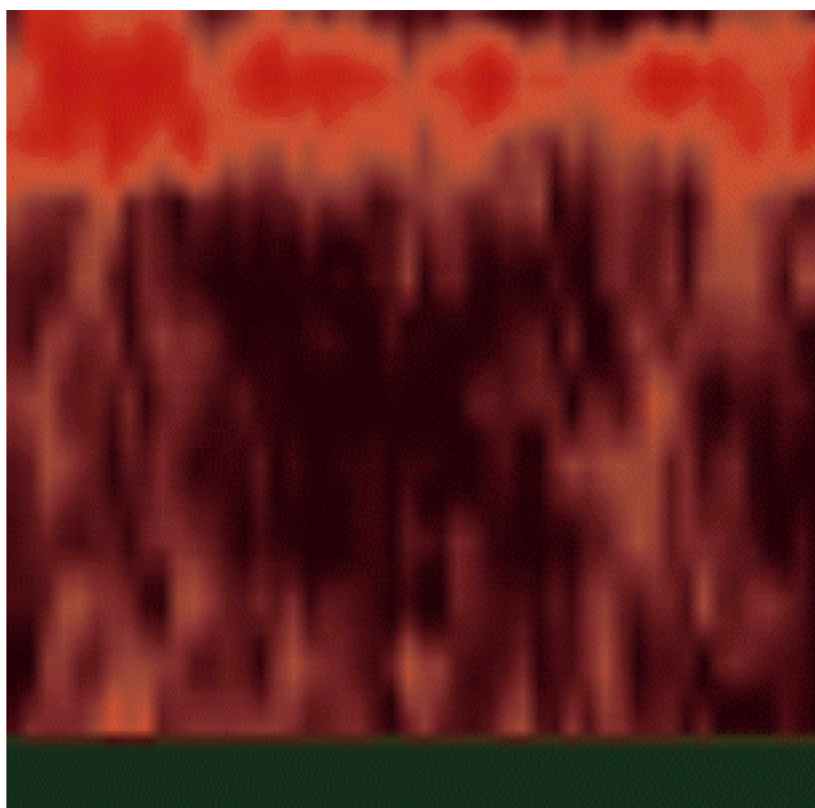


Figura . Distribución de Fn vesiculada. Resolución a 1 célula. Aumento de resolución (7X) de 1 célula, obtenida de la -B.

3.9 Caracterización de los compartimentos en que se localizan las diferentes poblaciones de Fn

Con el objetivo de obtener información respecto de la naturaleza del compartimento en que se encuentra la Fn de alta densidad, se determinó en los gradientes antes descritos, las actividades de enzimas marcadoras de citosol (LDH), retículo endoplásmico (NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A₁), mitocondrias (citocromo oxidasa), lisosomas (fosfatasa ácida) y aparato de Golgi (sialil transferasa), y se comparó a las densidades a las que fracciona Fn y el Fe de almacenaje, (Figura 16). Se observa que la Fn presente en fracciones de densidad 1,00-1,05 g/ml, cofraccionó solo con actividad LDH (marcadora de citosol), en cambio la Fn que fracciona a densidades de 1,08-1,12 g/ml, cofraccionó con actividades NADPH citocromo c reductasa (retículo endoplásmico) y sialil transferasa (aparato de Golgi). La Fn presente en fracciones de densidad 1,13-1,16 g/ml, la cual es detectable solo en el caso de células cultivadas a [Fe]_i: 270 μM, cofraccionó solo con actividad fosfatasa ácida (lisosomas).

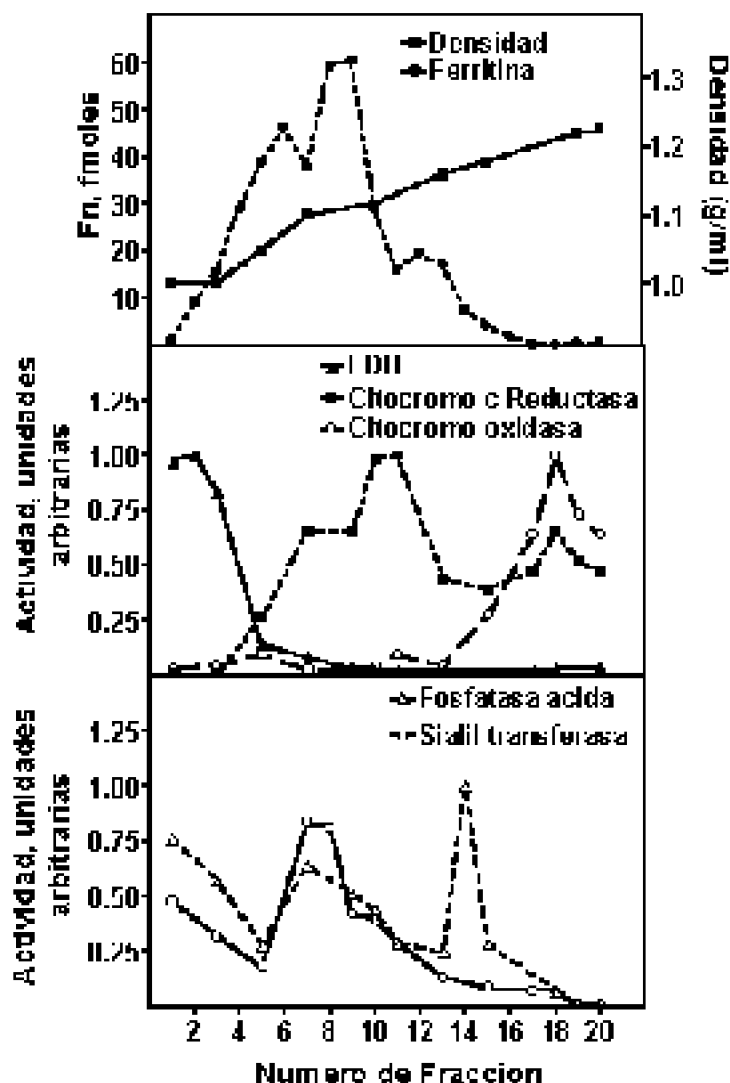


Figura . Caracterización de los compartimentos que cofraccionan con Fn en un fraccionamiento subcelular. Determinación de actividades de enzimas marcadoras de organelos y citosol. Extractos de células cultivadas a $[Fe]_i$: 270 μM , fueron sometidos a fraccionamiento subcelular. Se determinó en cada fracción, el contenido de Fn y la actividad de enzimas marcadoras: LDH (citosol), citocromo c reductasa insensible a antimicina (retículo endoplásmico), citocromo oxidasa (mitocondrias), fosfatasa ácida (lisosomas) y sialil transferasa (aparato de Golgi). Las actividades se representan en unidades arbitrarias relativas a la(s) fracción(es) con mayor actividad específica.

El hecho de que esta Fn de alta densidad cofraccione con actividad marcadora de lisosomas, sugiere que esta molécula puede encontrarse en un compartimento en el cual se realiza su catabolismo. Por lo tanto, se determinó en células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$ (16, 75 y 270 μM), la $t_{1/2}$ de la Fn presente en fracciones de densidad baja (1,00-1,05 g/ml), media (1,06-1,10 g/ml) y alta (1,13-1,16 g/ml), para determinar si en algunas de estas poblaciones el recambio es más rápido. Los resultados de la determinación de $t_{1/2}$, se resumen en la , junto a resultados antes descritos. Los datos resumidos en esta tabla

indican que la subunidad principal de Fn en células Caco-2, es la de tipo H. Solo a $[Fe]_i$ altos, se detectó una Fn que presenta subunidades de 18 kDa, menor al reportado para la subunidad L (20-22 kDa). La corta $t_{1/2}$ de la subunidad menor, su compartimentación y el cofraccionamiento con actividades lisosomales sugieren la posibilidad de que esta población de Fn se encuentre en proceso de degradación lisosomal.

Tabla . Características de la Fn presente a diferentes densidades de equilibrio en un fraccionamiento subcelular.

$[Fe]_i$, μM	Densidad de equilibrio Fn, g/ml	Abundancia	$t_{1/2}$, hr	PM, kDa
16	1,00-1,05	+	24	24
75	1,00-1,05 1,06-1,10	+ ++	25 24	24 24
270	1,00-1,05 1,06-1,10 1,11-1,16	2+1+13-1,16	25 24 6,5	24 24 18 y 24

Extractos de células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$ (16, 75 y 270 μM), fueron fraccionados en gradientes continuos de sacarosa. Se determinó, en cada fracción, el contenido de Fn, su $t_{1/2}$ y composición de subunidades.

3.10 Papel de la Fn en la unión de Fe de flujo

3.10.1 Fraccionamiento isopícnico del Fe de flujo incorporado a la célula

Para dilucidar si la población de Fn que fracciona a baja densidad (1,00 a 1,05 g/ml), participa del manejo de Fe de flujo, se sometió a células Caco-2 (cultivadas a $[Fe]_i$: 16 y 270 μM), a un pulso de ^{59}Fe -NTA (1 μM -2,2 μM) por 15 min y caza con Fe-NTA frío por distintos tiempos (15 a 60 min), se lisó las células con solución amortiguadora SM-saponina y se determinó la densidad de fraccionamiento del Fe de flujo incorporado a la célula, en gradientes continuos de sacarosa (20-60 % p/p), Figura 17. Los resultados indican que el Fe de flujo se incorporó inicialmente a fracciones de baja densidad (1,00-1,05 g/ml), tanto en células con bajo $[Fe]_i$ (16 μM) como en células con alto $[Fe]_i$ (270 μM). Después de 60 min de caza, el Fe de flujo se incorporó a fracciones de mediana densidad (1,06-1,10 g/ml), solo en células con bajo contenido de Fe ($[Fe]_i$: 16 μM). Es importante notar que a tiempos cortos de caza, las células que presentaban menor $[Fe]_i$ incorporaron más ^{59}Fe desde el medio apical y presentaron también mayor contenido de Fn en fracciones de baja densidad (1,00-1,05 g/ml). Posteriormente, cuando el ^{59}Fe se incorporó a fracciones de densidad media (1,06-1,10 g/ml), la señal de Fn parece desplazarse a densidades mayores, sugiriendo que ha incorporado Fe de flujo.

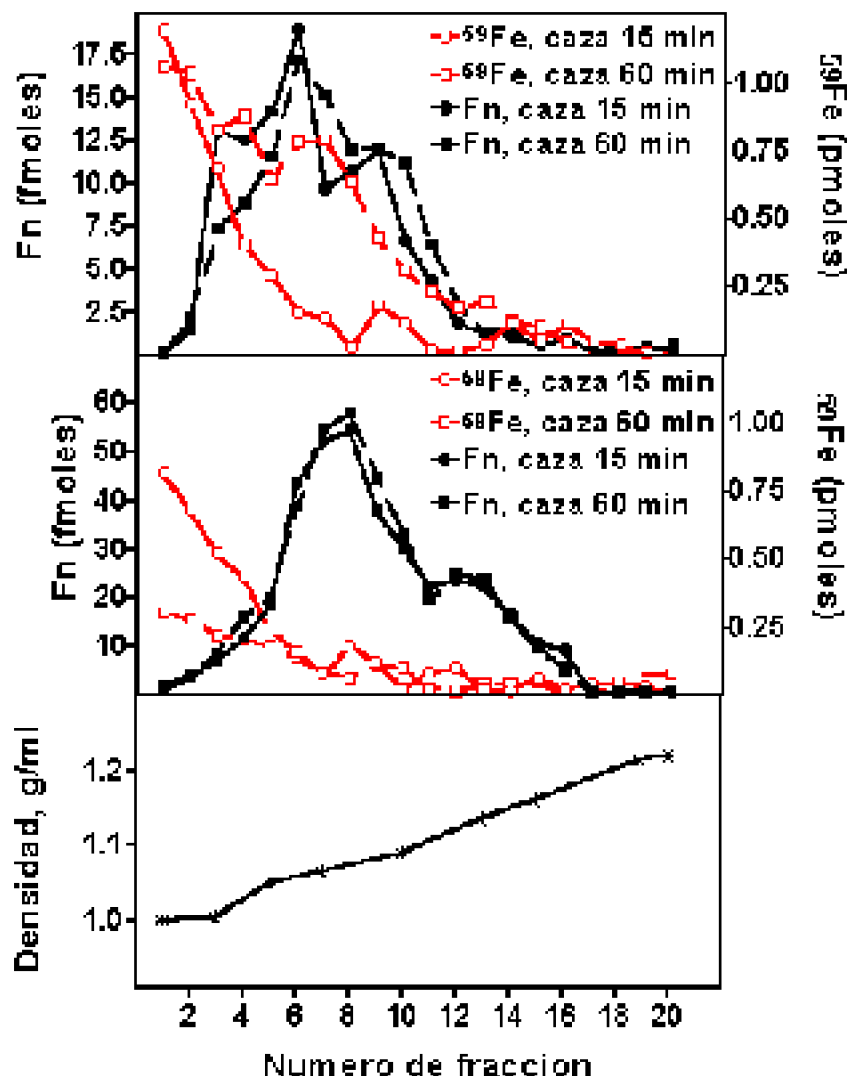


Figura . Fraccionamiento isopícnico del Fe de flujo incorporado a células cultivadas a distintos $[Fe]_i$. Células Caco-2, fueron cultivadas a $[Fe]_i$: 16 μM (panel superior) y 270 μM (panel medio), y sometidas a un pulso de ^{59}Fe -NTA (1 μM -2,2 μM) por 15 min y caza de 15 y 60 min. Se obtuvo extractos de estas células, utilizando la solución SM-saponina, los cuales fueron fraccionados en gradiente lineal de sacarosa (20-60 % p/p). Se determinó el ^{59}Fe y la Fn en alícuotas de las fracciones obtenidas. **Panel inferior: patrón de densidad de la gradiente utilizada.**

3.10.2 Incorporación de Fe de flujo a Fn

Con el objetivo de determinar la incorporación de Fe de flujo a Fn, se inmunoprecipitó la Fn y se determinó el ^{59}Fe que coprecipita con esta molécula (Figura 18). Los resultados indican que en células equilibradas con bajo contenido de Fe ($[Fe]_i$: 16 μM), la Fn captó hasta un 25% del Fe de flujo, pero esta relación disminuyó al aumentar el $[Fe]_i$ (de un 25 a < 1 % de captación de ^{59}Fe al aumentar el $[Fe]_i$ desde 16 a 270 μM). Cabe hacer notar

que al tiempo de caza de 60 min se obtuvo la máxima incorporación de Fe de flujo a Fn, tiempos de caza superiores (120 a 300 min), no modificaron los porcentajes máximos descritos (no mostrado).

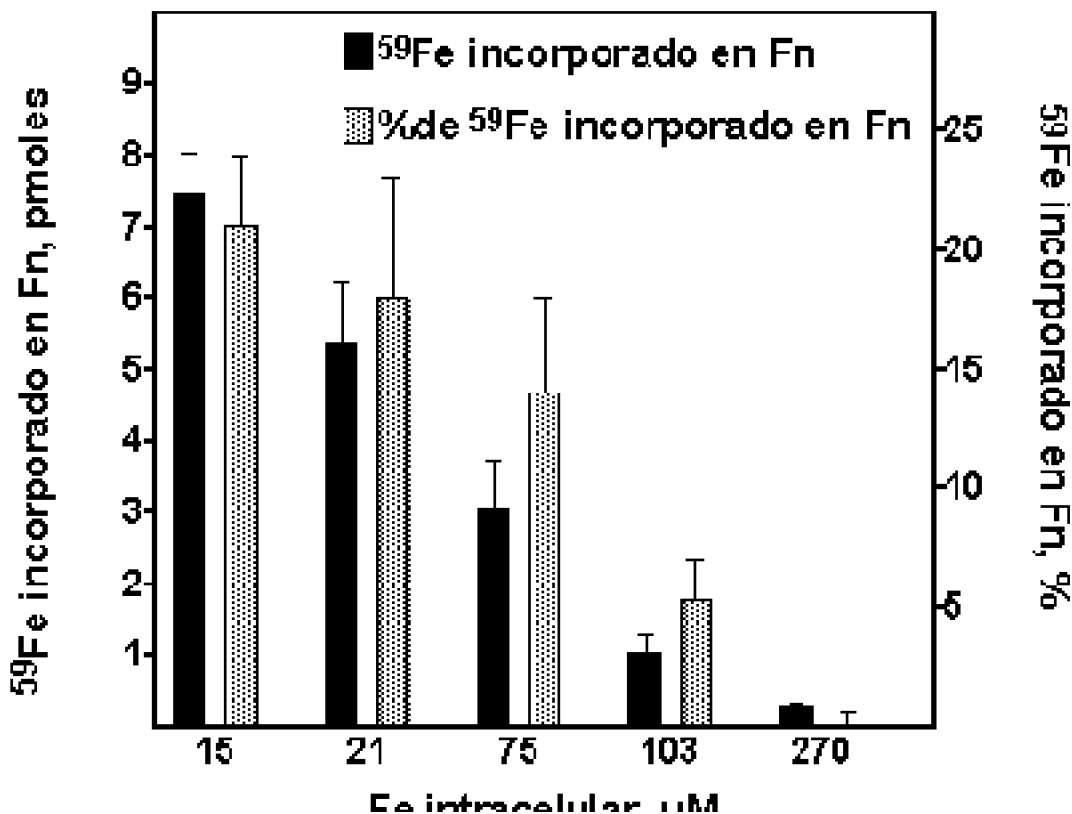


Figura . Determinación del Fe de flujo contenido en Fn. Extractos provenientes de células Caco-2 ($[Fe]_i$ 16-270 μM) que recibieron un pulso de 15 min de ^{59}Fe -NTA ($1\mu M$ - $2,2\mu M$) y caza de 60 min con Fe-NTA frío, fueron incubadas con α -Fn y posteriormente con proteína A-sefarosa. Se determinó el ^{59}Fe que coprecipitó con la Fn.

3.11 Determinación de la movilidad electroforética del Fe de flujo incorporado al citosol. Posibles proteínas que presentan un papel en la unión de Fe

Dado que solo una proporción limitada de Fe de flujo incorporado a la célula, es detectable en Fn, se estudió la posibilidad de que se incorporara a otras proteínas. Para esto, se colectó las fracciones de baja densidad, obtenidas por la metodología descrita en el resultado anterior y se cargó 10 μg de proteína en gel nativo al 5% acrilamida (Figura 19, izquierda). Al finalizar la electroforesis, se seccionó el gel en cortes de igual medida y se determinó la radiactividad de ^{59}Fe asociada a cada corte. Los resultados obtenidos se

muestran en la Figura 19, derecha. Como se observa en esta figura, el Fe de flujo incorporado al citosol presentó una movilidad electroforética con Rf de 0,3; 0,5 y 0,9. Estas señales representan un 20, 30 y 50 % del Fe de flujo incorporado, respectivamente.

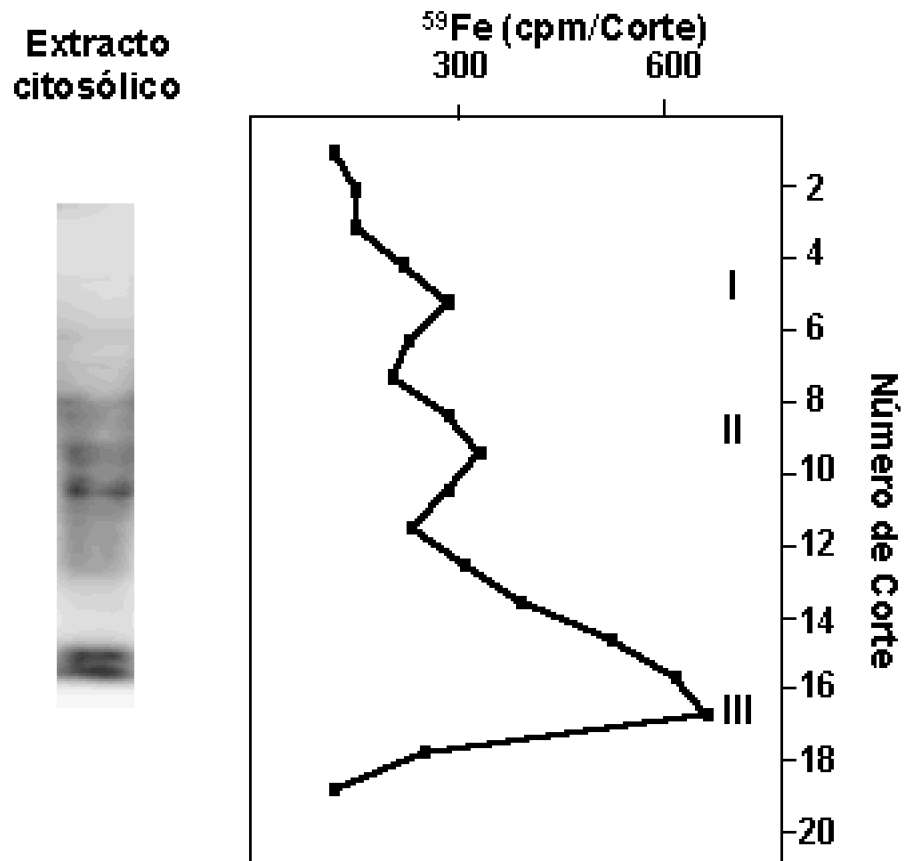


Figura . Determinación de la migración electroforética del Fe de flujo incorporado al citosol de células Caco-2. Izquierda : Fracciones citosólicas provenientes de células deficientes en Fe, sometidas a pulso de ^{59}Fe ($1\ \mu\text{M}$) por 30 min, fueron cargadas en un gel nativo (5 % acrilamida). Derecha : el gel fue cortado en secciones de igual dimensión y se determinó el contenido de ^{59}Fe (I, II y III señales de radiactividad más intensa).

Las proteínas presentes en los cortes que presentaron estas señales, fueron eluidas y cargadas en un gel de acrilamida al 10 % y migradas bajo condiciones denaturantes, posteriormente transferidas a nitrocelulosa y se realizó inmunodetección para diversas proteínas involucradas en el metabolismo del Fe (Fn, Cr, IRP, Tf y RTf). Las inmunodetecciones positivas se muestran en la Figura 20 (izquierda y centro). La señal I solo presentó inmunoreacción positiva para Fn (Figura 20, izquierda), el resultado presentado en esta figura, indica que la Fn citosólica presenta una alta proporción de subunidades de PM 23 kDa concordante a lo descrito para la subunidad H. La señal II, presentó inmunoreacción positiva para Cr con PM de 53 y 56 kDa (Figura 20, centro).

Por otra parte, la señal III no presentó inmunoreacción positiva para ninguna de las proteínas estudiadas, la tinción de plata de un gel gemelo al transferido, reveló una

proteína de aproximadamente 70 kDa de naturaleza desconocida, (Figura 20, derecha).

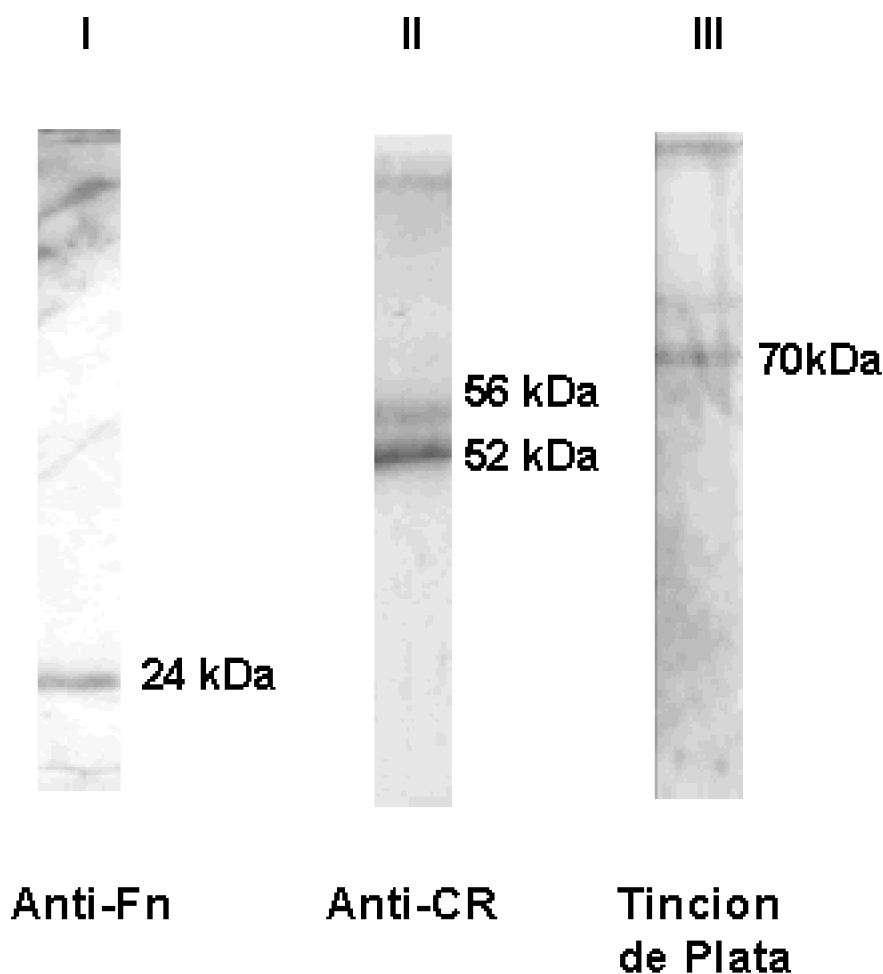


Figura . Posibles proteínas que participarían de la unión intracelular de Fe. Proteínas presentes en el eluido de las señales de ^{59}Fe obtenidas de gel nativo (Figura 19), migradas en un gel de poliacrilamida al 10 % bajo condiciones denaturantes, fueron inmunoreaccionadas con anticuerpos anti : Fn, Cr, IRP, Tf y RTf) I y II inmunodetecciones positivas de las señales I y II de la Figura 19. III tinción de plata de la señal III de la Figura 19.

3.12 Efecto del bloqueo funcional de Fn, mediante la adición de Zn^{2+} , sobre la incorporación de Fe de flujo a Fn

Los resultados anteriores sugieren que la Fn podría participar de la manipulación del Fe de flujo, por lo tanto se intentó obtener células con Fn funcionalmente bloqueada, de

modo tal que el Fe de flujo no pueda incorporarse a Fn. En trabajos anteriores se ha reportado que la incorporación de Fe en Fn puede ser bloqueada por la adición de Zn^{2+} (Niederer, 1970; Harrison, 1996), por lo tanto, se determinó si el almacenamiento de Fe en Fn o la captación de Fe de flujo eran bloqueables por la adición de Zn^{2+} al medio de cultivo, los resultados son resumidos en la Figura 21. Los resultados presentados en esta figura, indican que en células que presentan Fn funcionalmente bloqueada con Zn^{2+} , disminuyó la captación de Fe de flujo, pero no se modificó el contenido de Fe de almacenaje en Fn (no mostrado). La eficiencia del bloqueo en la captación de Fe de flujo, fue más notable a $[Fe]_i$ bajo (80 %, 60 % y 53 % para $[Fe]_i$ 16 μM , 21 μM , y 75 μM respectivamente y no significativo a $[Fe]_i$ mayores de 103 μM).

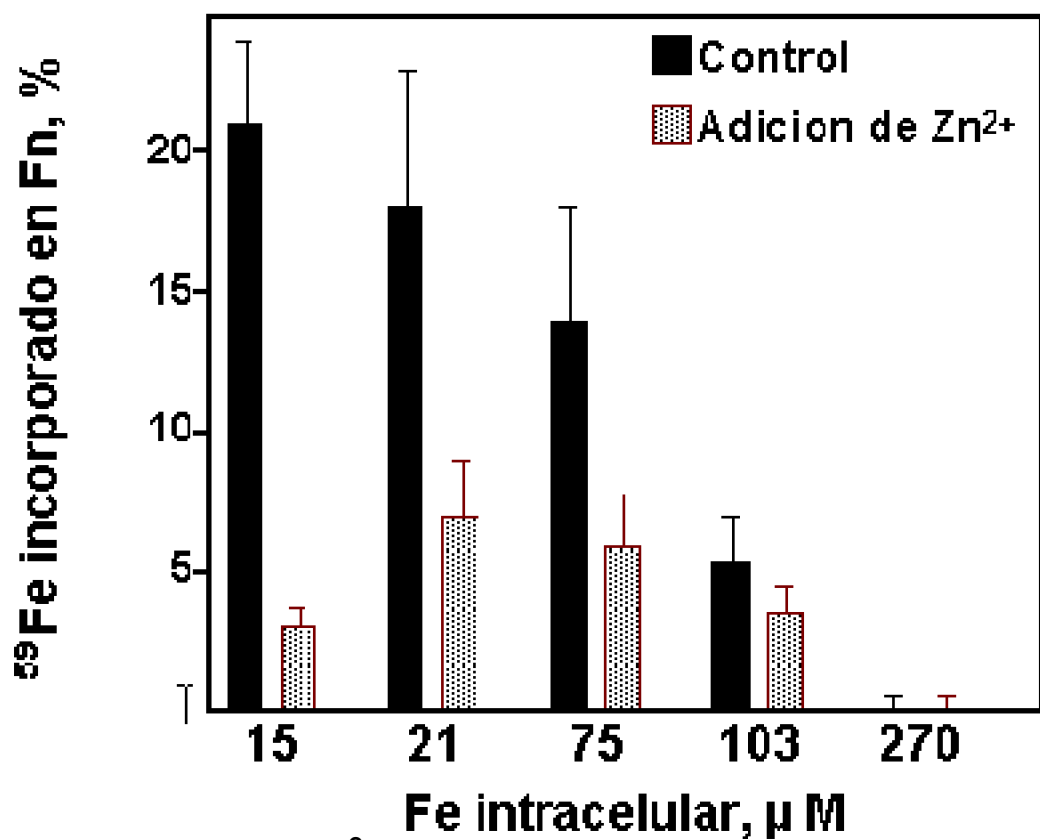


Figura . Influencia de la adición de Zn^{2+} a células Caco-2 cultivadas a distintos $[Fe]_i$, sobre la incorporación de Fe a Fn. Células Caco-2 cultivadas a distintos $[Fe]_i$ y tratadas con $ZnCl_2$, como fue descrito en métodos, fueron sometidas a flujo de ^{59}Fe . En extractos totales de estas células se inmunoprecipitó la Fn y se determinó su contenido de ^{59}Fe , frente a células no tratadas con $ZnCl_2$ (Control).

3.13 Efecto del bloqueo funcional de Fn, mediante la adición de Zn^{2+} , sobre el flujo transepitelial de Fe

Si la adición de Zn^{2+} disminuye la incorporación de Fe de flujo a Fn, entonces este ión podría quedar disponible para ser transportado al espacio basolateral. Por lo tanto, se determinó el flujo de ^{59}Fe al espacio basolateral en células que fueron cultivadas a distintos $[Fe]_i$ en presencia y ausencia de Zn^{2+} (Figura 22). Como se observa en esta figura, la adición de Zn^{2+} a los medios de cultivos de células equilibradas con distintos $[Fe]_i$, aumentó el flujo transepitelial de Fe en células con bajo $[Fe]_i$ (48 % y 20 % en células con $[Fe]_i$ 16 y 21 μM), a $[Fe]_i$ 75 μM el aumento de flujo fue de 13 %, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa. A $[Fe]_i$ mayores a 75 μM , la adición de Zn^{2+} no presentó influencia sobre el flujo.

Por lo tanto, la Fn presenta un papel limitado en el manejo de Fe de flujo, en el cual el grado de saturación de la Fn parece ser el factor limitante para la incorporación de Fe de flujo.

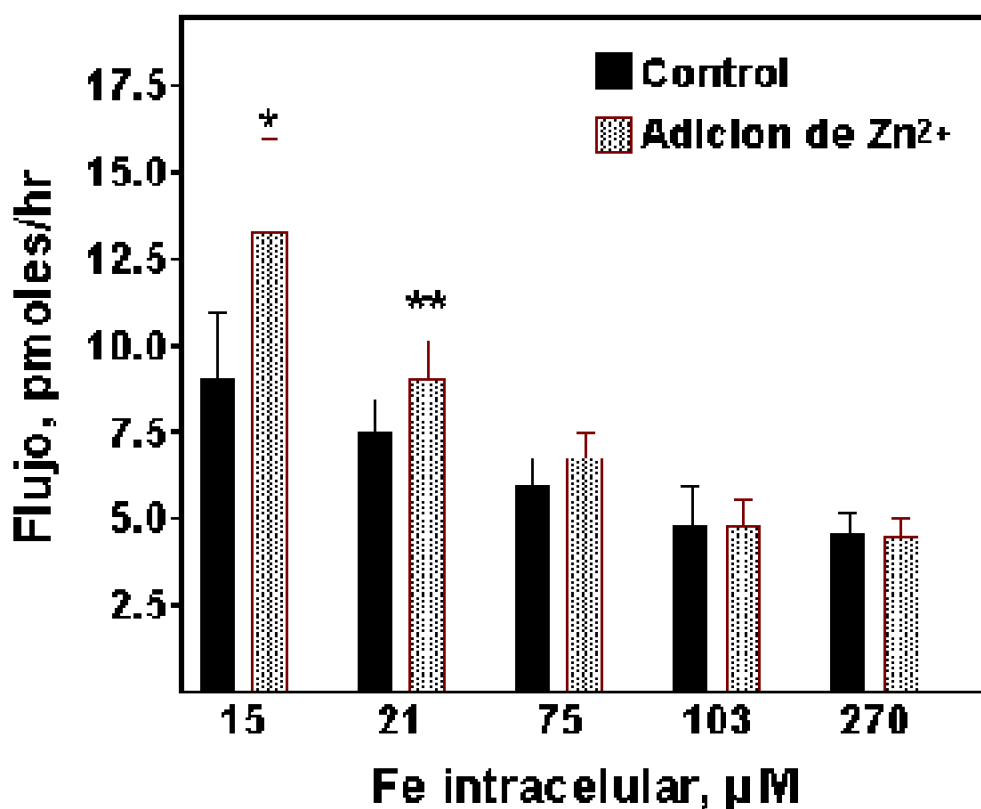


Figura . Influencia de la adición de Zn^{2+} a células Caco-2 cultivadas a distintos $[Fe]_i$ sobre el flujo transepitelial de Fe. Células Caco-2 cultivadas a distintos $[Fe]_i$ y tratadas con $ZnCl_2$, como fue descrito en métodos, fueron sometidas a flujo de ^{59}Fe . Se determinó el flujo de ^{59}Fe al basolateral, frente a células no tratadas con $ZnCl_2$ (Control).

3.14 Relación estado de óxido-reducción celular,

respecto a la $[Fe]_i$

Otro factor que podría influir sobre la capacidad de la Fn para incorporar Fe de flujo, es el estado de óxido-reducción celular. La incorporación de Fe por periodos prolongados, podría generar ambientes óxido-reductores diferentes en células cultivadas al equilibrio con diferentes $[Fe]_i$. Por lo tanto, con el objetivo de conocer la influencia de la $[Fe]_i$, sobre el estado de óxido-reducción celular, se cultivó células Caco-2 a diferentes $[Fe]_i$ y se determinó en ellas la relación GSH/GSSG,. Los resultados resumidos en esta tabla, indican que en células cultivadas al equilibrio con diferentes $[Fe]_i$, no se detectaron diferencias en la relación GSH/GSSG, por lo tanto el aumento de la $[Fe]_i$, no alteró el estado de oxido-reducción de estas células. La siguiente posibilidad es si al someter las células equilibradas a diferentes $[Fe]_i$, a experimentos de flujo de Fe, este proceso produce un desbalance en su estado de óxido-reducción. Los resultados obtenidos después de un flujo de ^{59}Fe -NTA (1 μ M-2,2 μ M) por 1hr, no difieren de los presentados en la Tabla 4 (no mostrado). Por lo tanto, el sistema utilizado para obtener células equilibradas con Fe no parece generar desbalances oxidativos.

Tabla . Determinación del estado de óxido-reducción celular, de células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$. A células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$ por 2 semanas, se les determinó el contenido de GSH y la relación GSH/GSSG, los valores se expresan como promedio de 5 determinaciones \pm DE.

$[Fe]_i$, μ M	GSH, nmol/ 10^6 cél	GSH /GSSG
16	26,2 \pm 2,80	30,2 \pm 4,80
84	28,2 \pm 0,91	23,72 \pm 5,70
270	28,1 \pm 1,36	24,00 \pm 5,30
360	29,1 \pm 1,70	28,00 \pm 5,80

3.15 Actividades GSH-Px y GSSG-Rd respecto a la $[Fe]_i$

Para dilucidar si este resultado es debido a un proceso de adaptación celular al estrés inducido por Fe, se determinó las actividades de 2 enzimas principales en el metabolismo del GSH, GSH-Px y GSSG-Rd a distintos $[Fe]_i$. Los resultados resumidos en esta tabla, indican que las actividades de ambas enzimas aumentaron en forma concomitante al aumento de la $[Fe]_i$, por lo tanto las células adaptaron su capacidad de detoxificar sustancias oxidantes a través del aumento en la actividad GSH-Px y son capaces de recuperar la relación GSH/GSSG a través del aumento en la actividad GSSG-Rd, presentando de esta manera un estado de óxido-reducción independiente de la $[Fe]_i$, bajo las condiciones de estudio.

Tabla . Actividad de enzimas involucradas en el metabolismo del GSH, respecto a la $[Fe]_i$. A células cultivadas a diferentes $[Fe]_i$ por 2 semanas, se les determinó las actividades de GSH-Px y GSSG-Rd, los

valores se expresan como promedio de 5 determinaciones \pm DE.

[Fe] _i , μ M	GSH-Px , U/mg Prot	GSSG-Rd, U/mg Prot
16	61,62 \pm 3,20	143,20 \pm 9,80
84	86,00 \pm 4,80	164,10 \pm 8,30
270	96,46 \pm 4,60	208,00 \pm 12,20

3.16 Movilización de Fe almacenado, mediante la adición de t-butOOH

Se evaluó la posibilidad de que la inducción de estrés oxidativo produjera movilización de Fe almacenado e influyera sobre el flujo transepitelial de Fe. En la Figura 23, se muestra la cinética de salida de Fe de almacenaje al basolateral en células con [Fe]_i : 75 μ M, preincubadas con t-butOOH 1 mM, frente a células con igual [Fe]_i, que no fueron preincubadas. Como se observa en esta figura, la preincubación con t-butOOH indujo un aumento transiente en el flujo de Fe de almacenaje desde la célula al basolateral (15 y 30 min). A los 60 min la cinética de liberación de Fe desde las células preincubadas con t-butOOH, disminuyó notablemente respecto a las células no tratadas. A tiempos superiores a 60 min las cinéticas de las células tratadas y controles se igualaron (no mostrado).

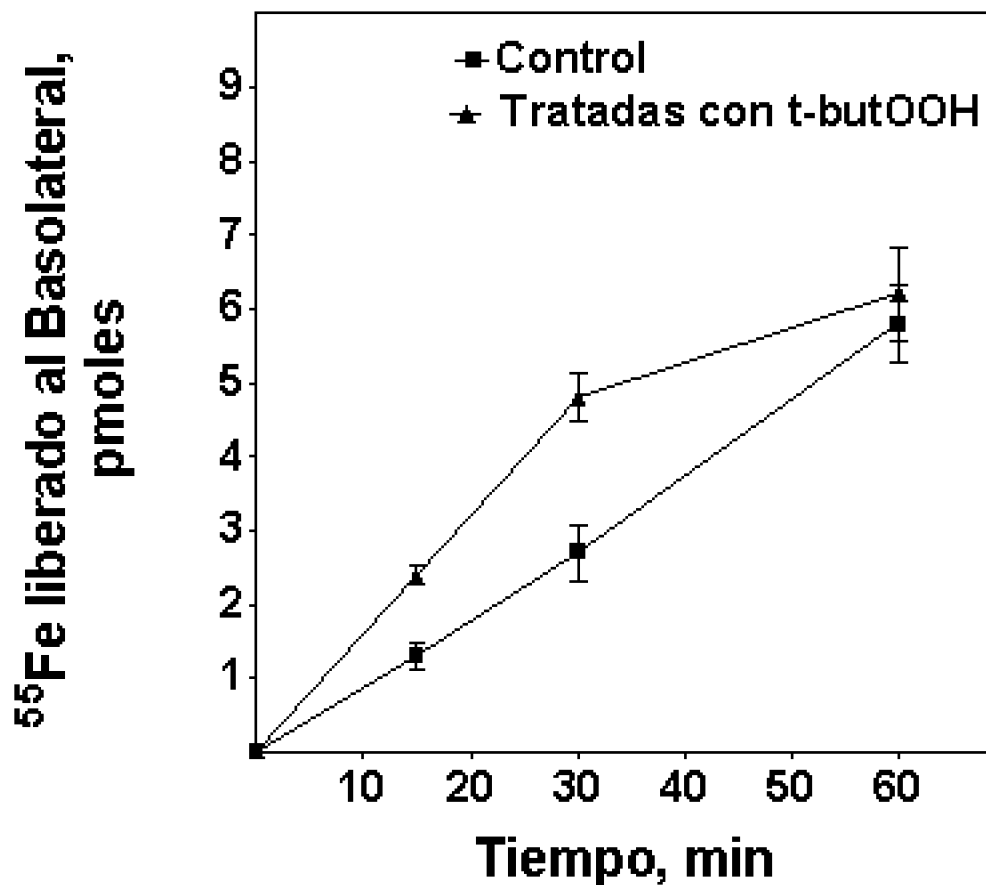


Figura . Influencia de la preincubación con t-butOOH, sobre la cinética de salida de Fe de almacenaje al basolateral. Células con $[Fe]_i$: $75 \mu M$ fueron preincubadas con t-butOOH $1 mM$ por $30 min$. Se determinó la aparición de Fe de almacenaje (^{55}Fe) en el medio basolateral, frente a células con igual $[Fe]_i$, que no fueron preincubadas con esta molécula.

3.17 Influencia de la adición de t-butOOH, sobre la absorción de Fe

Para evaluar si la preincubación con t-butOOH, influye sobre el flujo transepitelial de Fe, se cultivó células Caco-2 a $[Fe]_i$: $75 \mu M$ y se sometieron a un pulso con ^{59}Fe -NTA ($1 \mu M$ - $2,2 \mu M$) por $1 h$, se determinó el ^{59}Fe incorporado a las células y el transportado al basolateral, (Figura 24). Como se observa en esta figura, la preincubación de las células con t-butOOH, indujo una disminución tanto en la incorporación de Fe a las células, como también de su flujo transepitelial.

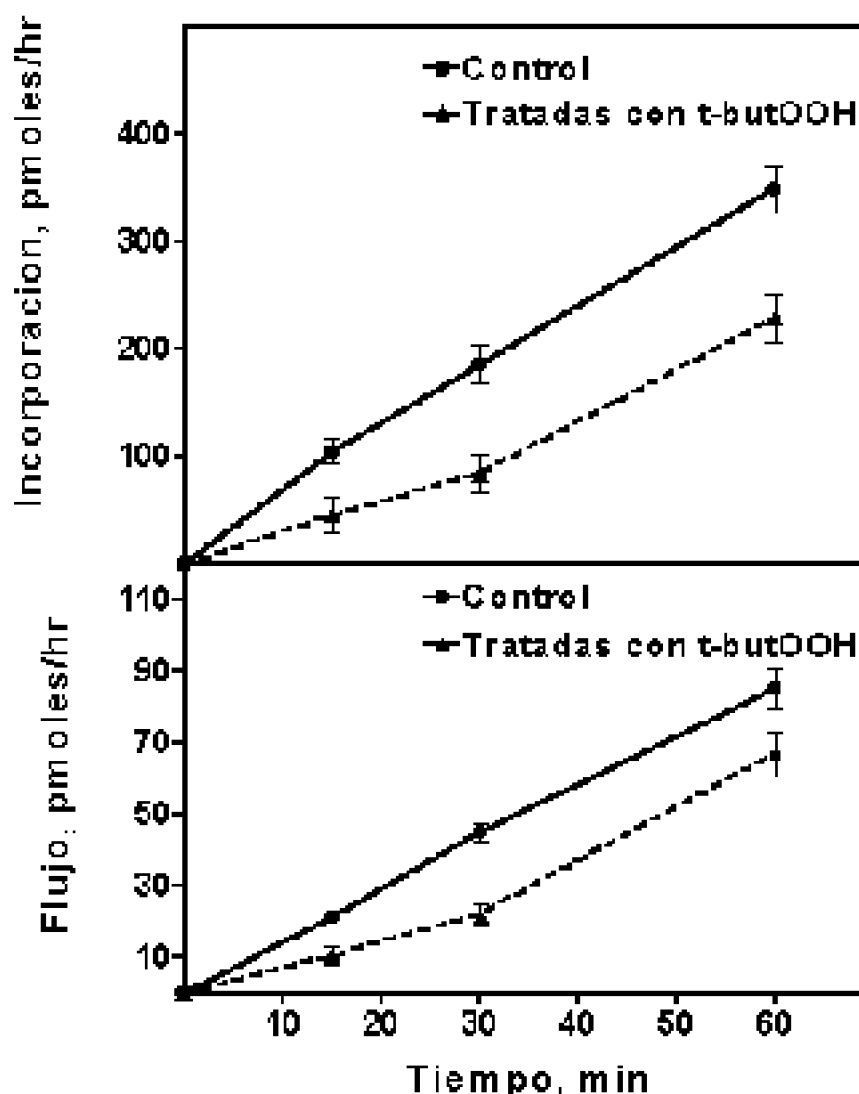
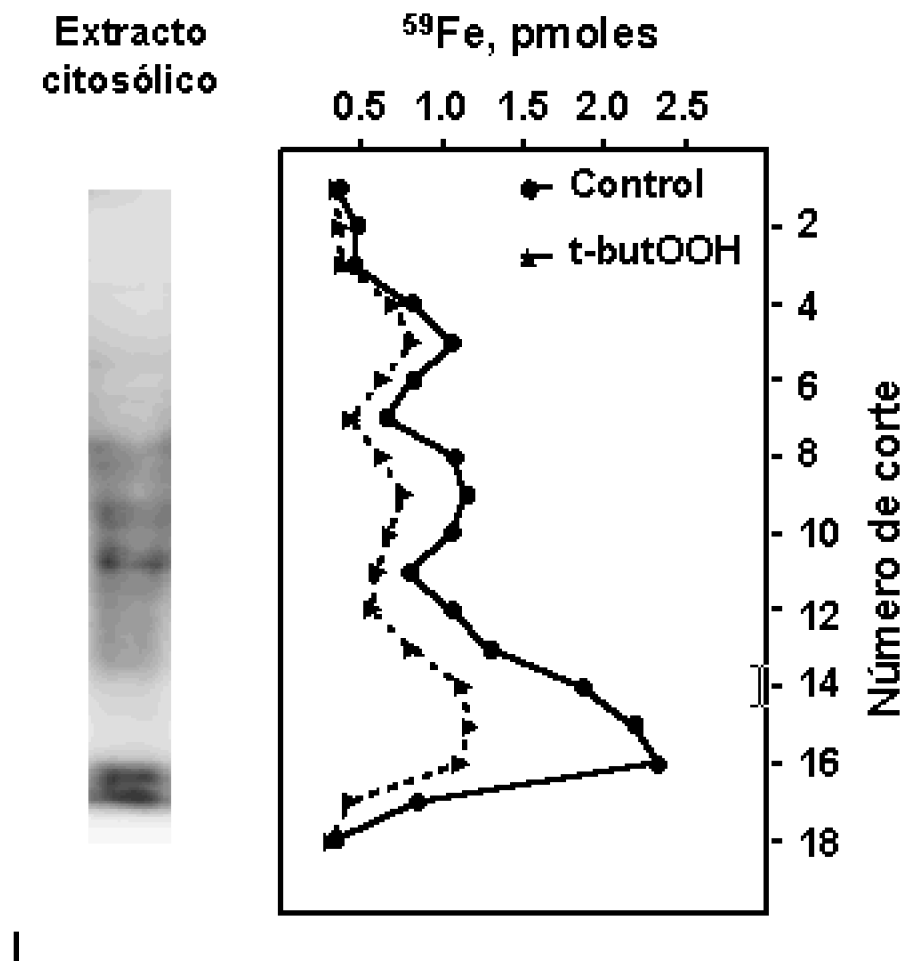


Figura . Influencia de la preincubación con t-butOOH de células Caco-2, cultivadas a $[Fe]_i$: 75 μM , sobre la incorporación y el flujo transepitelial de ^{59}Fe . Células Caco-2 cultivadas a $[Fe]_i$: 75 μM , preincubadas con t-butOOH 1 mM por 15 min, fueron sometidas a experimentos de flujo con ^{59}Fe -NTA (1 μM -2,2 μM) por distintos tiempos (15 a 60 min). Se determinó el ^{59}Fe incorporado a las células (panel superior) y transportado al basolateral (panel inferior), frente a células no tratadas con t-butOOH.

Para determinar si, la preincubación de las células Caco-2, con t-butOOH, modifica la incorporación del Fe de flujo a las proteínas que participan en su transporte intracelular, se preincubó células cultivadas a $[Fe]_i$: 16 μM (las que presentan la máxima incorporación de Fe de flujo) con t-butOOH y se sometieron, frente a células no preincubadas con esta molécula, a un experimento de flujo de ^{59}Fe -NTA (1 μM -2,2 μM). Al término del experimento, las células fueron lisadas utilizando solución amortiguadora SM-saponina, se centrifugó los lisados a 1.000 x g y se cargó alícuotas de los sobrenadantes en geles nativos de acrilamida al 5 %, Figura 25, izquierda. Estos geles fueron cortados en secciones de igual dimensión y se determinó la radioactividad de ^{59}Fe asociada a los

cortes (Figura 25, derecha). Como se observa en esta figura, la preincubación de las células con t-butOOH, disminuyó la incorporación de Fe de flujo a las 3 señales que retienen Fe. Esta disminución fue más importante en la señal III, que es el componente que manipula mayor cantidad de Fe de flujo. La variación del contenido de ^{59}Fe en la señal I, que como se describió anteriormente corresponde a Fn, no fue significativa. Por lo tanto, la alteración del estado de óxido-reducción celular, parece influir sobre la absorción del Fe, a través de proteínas distintas a Fn.

Figura . Influencia de la preincubación con t-butOOH de células Caco-2, cultivadas a $[\text{Fe}]_i$: 16 μM , sobre la migración electroforética del Fe de flujo incorporado al citosol. Células Caco-2 cultivadas a $[\text{Fe}]_i$ 16 μM , preincubadas con t-butOOH 1 mM por 15 min, fueron sometidas a experimentos de flujo con ^{59}Fe -NTA (1 μM -2,2 μM) por 60 min. Se determinó la migración electroforética del ^{59}Fe incorporado al citosol de estas células frente a células no tratadas con t-butOOH.



4. DISCUSIÓN

El modelo de absorción intestinal de Fe actualmente aceptado, propone que el LIP celular controla, la síntesis de proteínas involucradas en la absorción de Fe (Flanagan, 1989), esta regulación podría estar mediada por el sistema IRE/IRP (Rouault y col, 1989a; Arredondo y col, 1997, Wood y Han, 1998) . Se puede postular que, al aumentar el LIP disminuye la actividad IRP aumentando la traducción de Fn y la degradación del ARNm de RTf (Mullner y col, 1992, Yu y col, 1992, Tang y col 1992). Las células que han sufrido este proceso se tornarían más almacenadoras, por aumento del nivel de Fn y con menor capacidad de incorporar nuevo Fe vía endocitosis basolateral de FeTf. Al contrario, al disminuir la $[Fe]_i$, aumenta la actividad IRP y con esto disminuye la síntesis de Fn y aumenta la de RTf. Sobre la base de este modelo, se puede predecir que las células intestinales de individuos anémicos presentarían una alta absorción de Fe desde el lumen intestinal al plasma, y al mismo tiempo baja capacidad de retener este ión, con lo cual el organismo podría llegar, a la larga, a una paradójal sobrecarga corporal de Fe. Sin embargo, los antecedentes indican que los enterocitos actúan como un sensor del nivel corporal de Fe (Muir y col 1984, Flanagan, 1989, Snape y Simpson, 1991) y en estado de anemia absorben gran cantidad de Fe en el flujo vectorial lumen plasma, pero también retienen gran cantidad del Fe absorbido (Johnson y col, 1983, Fairweather-Tait y col, 1985), de esta forma el enterocito adapta su $[Fe]_i$ de manera tal que de cuenta del Fe que el organismo ha incorporado. Sin embargo, el aumento de Fn respecto a la $[Fe]_i$, podría disminuir el LIP celular y esto reactivaría la actividad IRP, inhibiendo la síntesis de Fn y aumentando la traducción del transportador y RTf. Por lo tanto, el motivo de esta tesis fue obtener nuevos detalles del papel que juega Fn en la absorción de Fe en células

intestinales.

Un problema fundamental para llevar a cabo estudios de absorción intestinal de Fe, es la carencia de modelos adecuados. Los estudios en órgano completo sólo permiten evaluar incorporación de Fe al intestino, absorción al plasma y al organismo entero (Fairweather-Tait y col, 1985), pero no son adecuados para determinar los detalles moleculares que sustentan el proceso. Se ha establecido que el enterocito es la célula que actúa como sensor del nivel de Fe (Flanagan, 1989) y se ha determinado que presenta las proteínas que participan de la absorción de Fe (Huebers y col, 1976, Johnson y col 1983, Orimo y col 1994). Sin embargo, al estudiar los eventos moleculares involucrados en el proceso de absorción de Fe en el enterocito, tanto el órgano completo, como el modelo de saco intestinal invertido resultan inadecuados, pues presentan interferencia de otras células (endotelio vascular o de la lamina propia), las cuales no responden a la $[Fe]_i$ como lo hace el enterocito y podrían llevar a errores de interpretación.

Dado que el objetivo general de esta tesis es aportar antecedentes respecto al papel que Fn cumple en la absorción de Fe del enterocito, fue necesario contar con un modelo celular que cumpliera con las propiedades descritas para el enterocito. Las células Caco-2 (derivadas de un cáncer de colon), fueron descritas como un excelente modelo para el estudio de secreción polarizada y destinación de proteínas (Hughes y col, 1988, Lee y col, 1988), y absorción vectorial de moléculas (Ranaldi y col, 1992, Anderberg y Artursson, 1993, Meunier y col, 1995). Estas células se diferencian a un fenotipo de intestino delgado, expresando en su superficie el marcador Glut-5 ausente en células del intestino grueso (Mahraoui y col, 1992). Al ser cultivadas en insertos bicamerales crecen formando monocapas, desarrollan uniones estrechas y presentan alta RET (Tapia y col, 1996). Presentan además un desarrollo polarizado, con un polo basolateral en el que se puede detectar RTf (Nunez y col, 1996) y un polo apical que presenta abundantes microvellosidades (Hidalgo y col, 1989), todas estas características de la morfología de los enterocitos. Si bien estas células, a diferencia de las que constituyen el epitelio intestinal, son homogéneas en edad, lo cual no permite visualizar los cambios en contenido de Fe y Fn que los enterocitos sufren en su proceso de envejecimiento hasta su descamación en la cripta intestinal. Sin embargo, estas células presentan grandes ventajas como modelo de enterocitos, ya que se puede obtener células equilibradas a diferentes $[Fe]_i$ con un protocolo simple (Tapia y col, 1996), además responden a dicha $[Fe]_i$ tanto en la absorción vectorial de Fe, como en la retención celular de este ión (Alvarez-Hernandez y col, 1991; Tapia y col 1996, Arredondo y col, 1997). A nivel molecular, las células Caco-2 presentan las proteínas involucradas en la absorción de Fe (RTf, Fn, IRP), además los niveles de Fn y RTf responden a la $[Fe]_i$ mediados por la actividad IRP, como fue descrito para los enterocitos (Arredondo y col, 1997). Todas estas características justifican el modelo de células Caco-2 para el estudio de eventos moleculares relacionados a la absorción de Fe en enterocitos.

Los resultados presentados en esta tesis indican que al cultivar células Caco-2 en insertos bicamerales, a diferentes concentraciones de Fe adicionado al medio de cultivo, en la forma ^{55}Fe -NTA (0,4 a 10,4 μM), se observó que las células aumentan tanto la $[Fe]_i$ como sus niveles de Fn, respecto a la concentración de Fe adicionado al medio (Figura

5). Estos resultados confirman descripciones anteriores realizadas con este sistema celular (Alvarez-Hernandez y col, 1991; Tapia y col, 1996, Arredondo y col, 1997). Por otra parte, es también destacable que el aumento en los niveles de Fn, respecto a la concentración de Fe en el medio extracelular, es menor al aumento en la $[Fe]_i$ (concordante a los resultados obtenidos por Arredondo y col (1997)). Este resultado puede implicar que a mayores $[Fe]_i$, una mayor proporción del Fe celular se encuentre en componentes distintos a Fn. Así, el aumento del LIP podría deberse a dicha proporción de Fe no almacenado en Fn. Otra posibilidad es que proteínas diferentes a Fn pueden participar de la unión del Fe intracelular al aumentar la $[Fe]_i$. Una tercera posibilidad es que la Fn presente un mayor grado de saturación de Fe. Para definir entre estas posibilidades, se determinó el Fe contenido en Fn en extractos celulares totales. La estrategia utilizada fue la inmunoprecipitación de Fn y determinación del Fe que coprecipita con esta proteína (Figura 6 y Figura 7). Los resultados obtenidos confirman a la Fn como principal proteína almacenadora de Fe a nivel intracelular, concordante a resultados obtenidos para diferentes tejidos (Huebers y col, 1976; Crichton y Ward, 1992). Como era esperable, el Fe contenido en Fn aumenta al aumentar la $[Fe]_i$. Sin embargo, al expresar este resultado como porcentaje de Fe contenido en Fn citosólica, respecto al Fe celular total, dicho porcentaje disminuye al aumentar la $[Fe]_i$. Es interesante notar que, en el sedimento de 1.000 x g, obtenido de la lisis celular con solución SM-saponina, hay Fn con niveles importantes de Fe. Al sumar este Fe al contenido en Fn citosólica se encuentra que, independiente de la $[Fe]_i$, la Fn presenta aproximadamente un 80 % del Fe celular. Diversas referencias han descrito que en procesos de sobrecarga de Fe, Fn con alto contenido de Fe forma microcuerpos insolubles fácilmente sedimentables (Selden y col 1980, Richter, 1984, Cox y col, 1991). Si se revisa los antecedentes descritos en las Figuras 2 y 3 (Arredondo y col, 1997), se encuentra que tanto la captación de Fe, como su flujo transepitelial, responden al aumento en la $[Fe]_i$, disminuyendo hasta alcanzar la estabilidad a una $[Fe]_i$ de aproximadamente 100 μ M. Además, si se observa la salida de Fe de almacenaje respecto a la $[Fe]_i$ (Figura 3), se encuentra que aumenta a partir de 100 μ M. Por lo tanto, se puede definir como un rango Deficiente-Normal las $[Fe]_i$ 16 a 103 μ M, ya que en este rango las células controlan su flujo transepitelial e incorporan de Fe de manera inversa a la $[Fe]_i$. En tanto el rango 103 a 480 μ M puede ser considerado como Sobrecarga, ya que al aumentar la $[Fe]_i$ no tan solo no disminuye el flujo transepitelial, sino también aumenta la secreción de Fe de almacenaje (Figura 3). Es en este rango de Sobrecarga donde se detectó la Fn sedimentable a 1.000 x g, la cual aumenta respecto a la $[Fe]_i$.

Por otra parte, es importante notar que la determinación de Fe y Fn en extracto total, indicó que el aumento en la $[Fe]_i$ es mayor al aumento en el nivel de Fn. Por lo tanto, que el 80 % del Fe celular se encuentre almacenado en Fn, independiente de la $[Fe]_i$, puede significar que el grado de saturación de Fn es mayor a $[Fe]_i$ más altas. Los experimentos de fraccionamiento subcelular en gradientes de sacarosa (Figura 8), indican que el Fe celular cofracciona con la Fn, la cual a mayor $[Fe]_i$ se desplaza a fracciones de densidad mayor, sugiriendo que la Fn presente a baja densidad de fraccionamiento (1,00-1,05 g/ml), presentaría un bajo contenido de Fe y que al aumentar la $[Fe]_i$, el grado de saturación de la Fn aumentaría y en forma concomitante su densidad de fraccionamiento. Esta posibilidad fue corroborada por el fraccionamiento de apoFn y holoFn (Figura 13),

así la apoFn fracciona a densidades 1,00-1,05 g/ml, en tanto la Fn cargada con Fe fracciona a densidades 1,08-1,12 g/ml. Por lo tanto al aumentar el Fe intracelular, aumenta la Fn, pero dado que es mayor el aumento del Fe, aumentaría el grado de saturación de la Fn, lo cual se reflejaría en su mayor densidad de fraccionamiento. Estos resultados, corroboran antecedentes reportados para mucosa intestinal de rata. Johnson y col (1983) describieron patrones de densidad de fraccionamiento de Fn en gradientes de sacarosa, los cuales indican la existencia de una señal principal de Fn a densidades 1,08-1,11 g/ml y señales menores a densidades 1,05-1,07 g/ml y 1,15-1,17. Además, la señal principal de Fn es la que cofracciona con la señal principal de Fe.

Sin embargo, el cofraccionamiento de Fe con Fn no es una prueba definitiva de que el ión se encuentre almacenado en la Fn. Al inmunoprecipitar la Fn presente en las fracciones de densidad 1,08-1,12 g/ml (Figura 9), se encontró que el Fe que coprecipita con Fn varía según la $[Fe]_i$, en tanto la fracción de Fn de baja densidad no contiene una gran cantidad de Fe. En el rango de $[Fe]_i$ de Sobrecarga se observa una señal de Fn de densidad de fraccionamiento 1,13-1,16 g/ml, no presente en las células del rango Deficiente-Normal. Estos resultados resumidos en la Tabla 2, indican que la Fn presente en fracciones de baja densidad, presenta una baja relación átomo de Fe/molécula de Fn, en tanto la Fn presente en las fracciones de densidad 1,06-1,10 g/ml aumenta dicha relación respecto a la $[Fe]_i$. Los valores presentados para esta última fracción, concuerdan con lo reportado para Fn de mucosa intestinal de rata, la cual presenta en estado normal alrededor de 800 átomos de Fe/molécula de Fn (Huebers y col, 1976), en humanos se ha estimado una relación de 1.200-1.400 átomos de Fe/molécula de Fn (revisado en Beard y col, 1997), los resultados presentados en la Tabla 2 y la Figura 9 permiten estimar que para células con $[Fe]_i$ 16, 103 y 270 μ M dicha relación es aproximadamente 500, 2.000 y 3.000 átomos de Fe/molécula de Fn, respectivamente, lo cual permite confirmar los rangos de normalidad de Fe antes definidos. Estos resultados fueron corroborados también por autoradiografía e inmunodetección (Figura 10 y Figura 11). La inmunodetección de Fn denaturada indicó que la subunidad H es la preferencial del oligómero de la Fn presente en células Caco-2 (Figura 11). Es importante notar, que en las fracciones 1,13-1,16 g/ml se observa una señal de Fn débil, y, por el contrario una señal de Fe fuerte en la autoradiografía (Figura 10). Estas fracciones presentan además de la subunidad H, una subunidad de PM 18 kDa en una proporción 1:1 respecto a la subunidad H (Figura 11). Esta señal de bajo PM podría corresponder a la subunidad L de Fn (PM 20-22 kDa, como fue descrito por Crichton y Ward, (1992)), lo cual explicaría su mayor capacidad de almacenaje de Fe. Sin embargo, su cofraccionamiento con actividad enzimática marcadora de lisosomas (Figura 16) y la corta $t_{1/2}$ de esta población de Fn (6,5 hr, Tabla 3), sugiere que puede ser producto de degradación lisosomal de la molécula. El hecho que esta población de Fn está presente en células con sobrecarga de Fe, concuerda con lo revisado por Beard y col (1997), quien describe que moléculas de Fn cargadas con 1.200 a 1.400 átomos de Fe, incorporan rápidamente nuevos átomos, en cambio moléculas de Fn cargadas con 4.000 átomos de Fe van a degradación. Se ha reportado que el producto de la degradación de la Fn es la hemosiderina, a la cual se le ha descrito un PM de 17-19 kDa (Andrews y col, 1987) y capacidad de almacenaje de Fe de ~2.000 átomos de Fe/molécula (Andrews y col, 1987). Esta proteína presenta una débil inmunoreacción con anticuerpos antiFn (Hoy y Jacobs, 1981). Debido a la alta

densidad a la que fracciona esta población de Fn, se determinó si se encontraba en un compartimento membranoso. Los resultados de sensibilidad a detergente, indican que esta población de Fn se encuentra protegida por membranas, que al ser solubilizadas con detergente liberan Fn y Fe, los cuales son detectables al fondo del gradiente (Figura 12). Estos resultados concuerdan con lo reportado para Fn, de mucosa intestinal de rata, saturada en Fe, la cual presenta una densidad de aproximadamente 1,8 g/ml' (Huebers y col 1976), lo que la sitúa fuera del rango de densidades del gradiente (1,00 a 1,30 g/ml). Sin embargo, la posibilidad de que Fn se este degradando en lisosomas (como respuesta a la sobrecarga de Fe), es contradictoria respecto a la escasa presencia de actividad enzimática marcadora de lisosomas (fosfatasa ácida), en los extractos preparados con SM-saponina (Tabla 1, Métodos). Estos extractos presentan actividades muy bajas de enzimas marcadoras de organelos, en tanto la mayor parte de la Fn está presente en ellos. Una posibilidad es que la Fn presente en el sedimento de 1.000 x g (Figura 7), sea Fn en proceso de degradación lisosomal y que la obtenida en el extracto, corresponda a Fn libre en el citosol (fracciones de densidad 1,00 a 1,12 g/ml, Figura 8) y Fn en vesículas lisosomales livianas (fracciones de densidad 1,13 a 1,16 g /ml, Figura 8). Aun así, esta alternativa no explica como una proteína citosólica, como la Fn, llega a degradarse en lisosomas. La inmunodetección mediante microscopía confocal, comprueba la existencia de una población de Fn vesicular (Figura 14), e indica que su localización es perinuclear (Figura 15). Este resultado concuerda con lo reportado para la degradación por autofagia, la cual se ha mostrado en otras líneas celulares ocurre en compartimentos membranosos perinucleares (Biederbick y col, 1995). Por lo tanto, la presencia de Fn en un compartimento membranoso, puede ser debida a un proceso de autofagia favorecido por Fe, cuyo producto de degradación sería un péptido de 18 kDa, lo cual concuerda con la descripción de la generación de hemosiderina (Andrews y col, 1987, Braumann y col, 1994, revisado en Beard, 1997).

En resumen, los resultados hasta aquí descritos indican que al aumentar el Fe intracelular desde un estado de deficiencia hasta uno de sobrecarga, aumentó el nivel de Fn y en forma concomitante el Fe almacenado en esta molécula. El aumento de Fe en Fn fue mayor al aumento de la masa de Fn, por lo tanto se produce saturación de esta molécula en el rango de Sobrecarga de Fe, lo cual podría inducir la degradación de la Fn, posiblemente por mecanismo de autofagia (Figura 26).

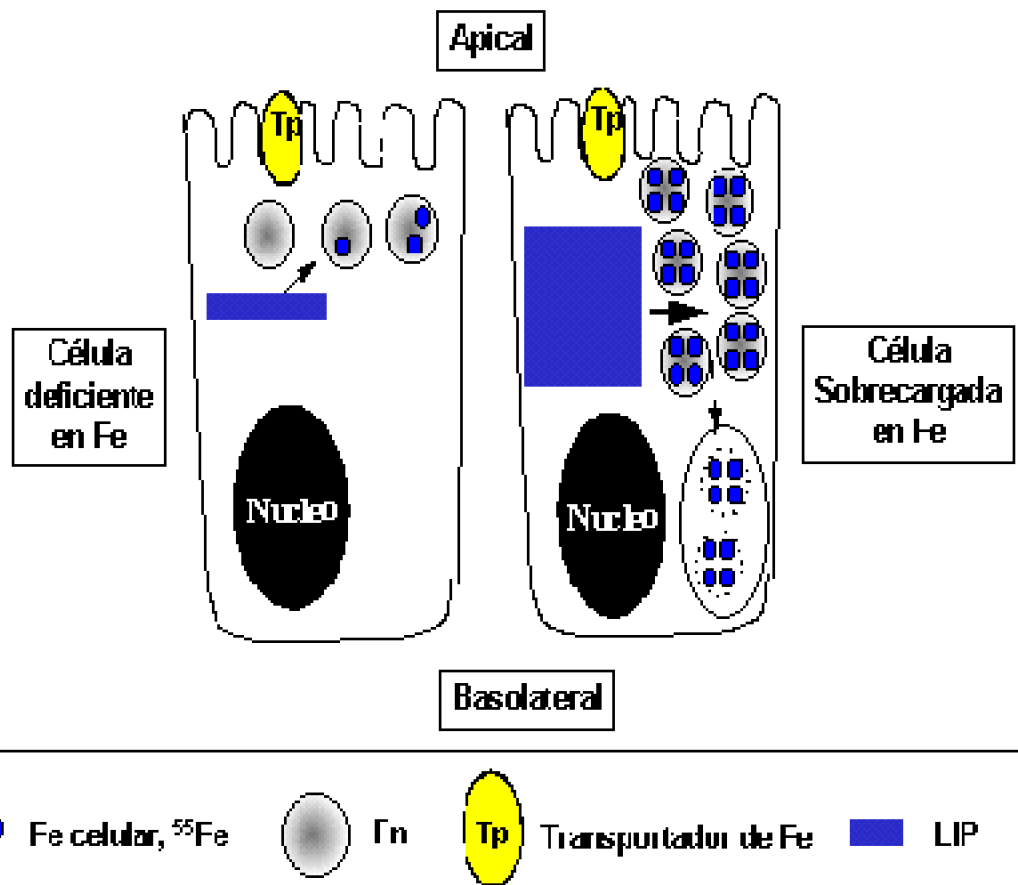


Figura . Modelo propuesto para la relación nivel de Fn respecto al Fe celular. Las células deficientes en Fe presentan Fn libre en el citosol, con un bajo grado de saturación de Fe. Las células sobrecargadas en Fe presentan Fn saturada en este ión y una población de Fn en proceso de degradación lisosomal, inducida por la sobrecarga de Fe.

Teniendo en cuenta el modelo de absorción intestinal de Fe, la Fn puede cumplir un papel en la retención de alguna proporción de Fe de flujo respecto a la $[Fe]_i$, pues en el rango Deficiente-Normal la Fn presenta una baja relación átomos de Fe/molécula de Fn y por lo tanto se puede suponer que presentará cierta avidez por el Fe recientemente incorporado, lo que concuerda con las observaciones que describen que la mucosa intestinal de individuos anémicos absorbe, pero también retiene mayor cantidad de Fe (Johnson y col, 1983, Fairweather-Tait y col, 1985).

Los resultados obtenidos en los experimentos de flujo de Fe (Figura 17 y Figura 18), concuerdan con el supuesto de que a menor saturación, la Fn presenta mayor capacidad de captar Fe de flujo. En primer lugar, el Fe de flujo se incorporó a la célula tempranamente en fracciones de baja densidad (Figura 17), las cuales cofraccionaron con actividad marcadora de citosol (Figura 16). A tiempos de caza cortos (15 min), la incorporación de Fe de flujo a las células presentó una relación inversa respecto a la $[Fe]_i$ (Figura 17), por lo tanto hay un paso de regulación previo al almacenaje del Fe de flujo en

la Fn, que con una alta probabilidad correspondería al proceso de incorporación apical de Fe. A tiempos de caza de 60 min, se detectó en células deficientes en Fe, importantes niveles del Fe de flujo en fracciones que también presentaron Fn, lo cual no ocurre en células en estado de Sobrecarga de Fe (Figura 17). Al inmunoprecipitar la Fn y determinar el Fe de flujo que se incorporó a ella, se encontró también que las células cultivadas a $[Fe]_i$ bajas, incorporaron Fe de flujo a Fn con un máximo de 25 % del total del Fe de flujo incorporado a la célula (Figura 18). Es importante notar, que al aumentar la $[Fe]_i$, el Fe de flujo incorporado a Fn disminuyó no tan solo como cantidad, sino también como porcentaje del total incorporado (Figura 18), el cual también disminuyó respecto a la $[Fe]_i$ (Figura 17). Si también se considera que al aumentar la $[Fe]_i$, aumentó el nivel de Fn, esto indica que la incorporación específica de Fe de flujo a Fn disminuye fuertemente al aumentar la $[Fe]_i$, resultado que corrobora las observaciones descritas por Johnson y col (1983) y Fairweather-Tait y col (1985), para mucosa intestinal de rata. Estos resultados sugieren que en células deficientes en Fe la Fn presenta baja saturación de Fe y por lo tanto puede incorporar una cantidad limitada de Fe de flujo, en tanto las células sobrecargadas de Fe presentarían Fn saturada en este ión e inhabilitada para unir Fe de flujo (Figura 27).

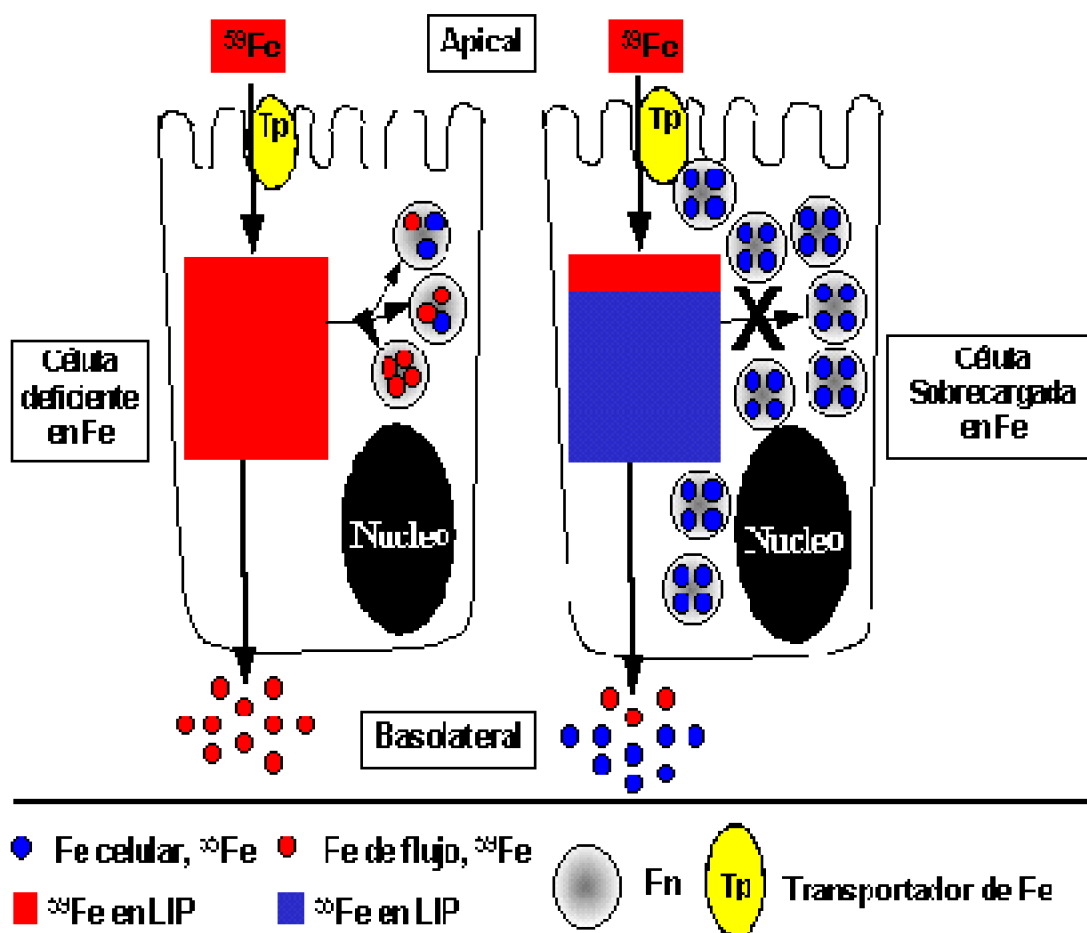


Figura . Modelo propuesto para la capacidad de unir Fe flujo, que la Fn presenta en

células en estado de deficiencia y sobrecarga de Fe Debido a su bajo LIP, las células deficientes en Fe, incorporan y transportan al basolateral gran cantidad de Fe de flujo, además unen una cantidad limitada de este ión a Fn. Las células sobrecargadas en Fe, incorporan y transportan al basolateral baja cantidad de Fe de flujo y no lo incorporan a Fn ya que se encuentra saturada.

Se ha descrito en mucosa intestinal de rata, que la Fn participa del manejo de una fracción del Fe de flujo, presentando mayor importancia proteínas diferentes a Fn (Johnson y col, 1983; Orimo y col, 1994). Así, se ha propuesto que Tf puede presentar un papel en este proceso (Johnson y col, 1983) y también se han descrito proteínas de 137, 107 y 78 kDa (Orimo y col, 1994) 60 kDa (Conrad y col, 1990) y un péptido de 10 kDa (Johnson y col, 1983), los cuales podrían participar también de este proceso. El estudio realizado en esta tesis (Figura 19), indica que al migrar extracto citosólico de células sometidas a un pulso de ^{59}Fe en un gel no denaturante, se detectan 3 señales de radiactividad. Por inmunodetección, se identificó la primera de estas señales como Fn (Figura 20), con un PM principal de 24 kDa (en electroforesis de geles denaturantes), que concuerda con el PM descrito para la subunidad H de este oligómero (Crichton y Ward, 1992). El que la subunidad H sea el componente principal del oligómero de Fn intestinal concuerda con lo descrito por Huebers y col (1976) y podría estar relacionado al papel que esta molécula debe cumplir en la mucosa intestinal. Este órgano, corresponde a una barrera de paso para el Fe, a diferencia del hígado que es un órgano de almacenaje, por lo tanto la Fn debería constituir un elemento amortiguador del exceso de Fe incorporado al citosol en el estado Fe^{2+} (forma en la cual el Fe es tóxico y prooxidante (Wrigglesworth y Baum, 1980)), y no un acumulador de Fe como sería un oligómero constituido preferencialmente por subunidades L (Levi y col, 1994). Este resultado concuerda además con los resultados antes discutidos, respecto a que Fn presenta un papel limitado en la unión de Fe de flujo. Respecto a las otras señales de radiactividad asociada a ^{59}Fe descritas en este trabajo, la señal II (Figura 19), presentó inmunoreacción positiva para Cr (Figura 20), lo cual concuerda con lo descrito por Conrad y col (1990), para una proteína homóloga a Cr denominada Mobilferrina. Se ha descrito que esta proteína de PM 55 kDa, une Fe con baja afinidad y actuaría como un factor de distribución intracelular del ión. En esta tesis, se le determinó como una doble banda de 52 y 56 kDa (Figura 20), y una capacidad de manipular Fe de flujo de aproximadamente 30 % (Figura 19), respecto al total de Fe de flujo incorporado. Del experimento descrito, se identificó también una proteína, de PM 70 kDa, que no reaccionó con ninguno de los anticuerpos probados en este trabajo (Figura 20). En trabajos realizados en mucosa de rata, se ha descrito la participación de Tf, proteína de aproximadamente 80 kDa (Orimo y col, 1994). Es importante notar que tanto las células de la mucosa intestinal, como las del modelo utilizado en esta tesis no presentan Tf endógena (Parmley y col, 1985), por lo tanto, la Tf reportada proviene de la incorporación por endocitosis mediada por receptor desde el plasma sanguíneo (Parmley y col, 1985; Shah y Shin, 1994). En el modelo utilizado, el medio basolateral no presenta Tf, por lo tanto era esperable que estas células no presentaran reacción positiva para esta molécula además se ha descrito para ella una participación muy limitada en la unión de Fe a nivel intracelular (Johnson y col, 1983; Orimo y col, 1994). Otra proteína presente en la mucosa intestinal, la cual se ha descrito que presenta capacidad de unir Fe es la "Proteína tipo Tf", llamada así porque presenta

un PM de 76 kDa y características similares a Tf en cuanto a su capacidad y afinidad por Fe, pero difieren en su punto isoeléctrico y composición aminoacídica (Huebers y col, 1976). Dado que no hay disponible información reciente respecto a las propiedades de esta proteína, como tampoco sobre su secuencia, ni existen anticuerpos comerciales para estudiarla, fue imposible evaluar la posibilidad de que corresponda a la proteína que une el Fe de flujo detectado en la señal III (Figura 19).

Dado que una de las interrogantes de esta tesis, era definir si la Fn al incorporar Fe de flujo disminuye el flujo vectorial apical-basolateral o si este flujo está definido por otros factores y Fn solo capta la diferencia entre el Fe incorporado y el Fe que sale al basolateral, se intentó el bloqueo de esta molécula y se determinó el flujo de Fe bajo esta condición, respecto a células en las cuales la Fn no estaba bloqueada. Esta estrategia fue llevada a cabo, utilizando Zn^{2+} como agente bloqueador de la Fn. Se ha demostrado que el Zn^{2+} se une a los canales de entrada de Fe, presentes en el oligómero de Fn (Niederer, 1970; Harrison, 1996) y bloquea la incorporación de Fe (Niederer, 1970), además se ha descrito que las células Caco-2 absorben este ión y lo incorporan a su citosol (Han y col, 1994; Finley y col, 1995) y que no interfiere con la absorción de Fe en humanos (Rossander-Hulten y col 1991). Por lo tanto, se buscó las condiciones de concentración y tiempo de incubación con $ZnCl_2$ que produjera la máxima inhibición de la incorporación de Fe de flujo a cada $[Fe]_i$, sin afectar el Fe almacenado en Fn, ni el Fe celular total. Como se describió en resultados, el protocolo utilizado bloqueó la incorporación de Fe de flujo a Fn, dando cuenta prácticamente de toda la capacidad de captar Fe recientemente incorporado al citosol, que esta molécula presentaba antes del tratamiento (Figura 21). La adición de $ZnCl_2$ disminuyó la incorporación de Fe de flujo a Fn, a niveles prácticamente indetectables, pero no afectó los niveles de Fe previamente almacenado en Fn (no mostrado). Por lo tanto, con este protocolo disminuye la posibilidad de que parte del Fe almacenado en Fn pase a formar parte del LIP, afectando de esta manera la incorporación de Fe en la membrana apical o su flujo al basolateral y las diferencias que se detectaron en este flujo vectorial fueron debidas solo a la capacidad de captación de Fe extra que la Fn presentaba previo al bloqueo. El efecto de la adición de Zn^{2+} , sobre la capacidad de la Fn para unir Fe de flujo es más notable a $[Fe]_i$ baja (Figura 21). Este resultado concuerda con los antes descritos respecto al grado de saturación de la Fn (Figuras 8-10, 13, y Tabla 2, resumido en Figuras 26 y 27). Al bloquear la Fn en células cultivadas a $[Fe]_i$ 16 μ M (las cuales presentan la más alta incorporación de Fe a Fn), se detecta la mayor diferencia entre las células tratadas con Zn^{2+} y las no tratadas. En el rango de $[Fe]_i$ 16 μ M a 75 μ M las células disminuyen su incorporación de Fe a Fn conforme aumentan su $[Fe]_i$ y el efecto de la adición de Zn^{2+} es menor (Figura 21). Por lo tanto, la Fn aumenta su grado de saturación en Fe al aumentar la $[Fe]_i$ y pierde capacidad de unir Fe recientemente incorporado, la adición de Zn^{2+} bloquea este proceso de unión de Fe, por lo que su efecto es más notable a $[Fe]_i$ baja, donde la capacidad de incorporación de nuevo Fe en Fn es máxima. El bloqueo funcional de la Fn, mediante la adición de Zn^{2+} , indica además que la Fn presenta un papel limitado en la modificación del flujo transepitelial de Fe. Así, las células cultivadas a $[Fe]_i$ 16 μ M, a las cuales se les adicionó $ZnCl_2$, aumentaron su flujo transepitelial de Fe (Figura 22), sugiriendo que el Fe que no se incorporó a Fn, pasó a formar parte de la población de Fe transportable. Sin embargo, en células cultivadas a $[Fe]_i$ mayores (21 μ M

a 75 μM), disminuye la influencia del bloqueo de Fn sobre el flujo transepitelial de Fe, hasta hacerse indetectable a $[\text{Fe}]_i 103 \mu\text{M}$ (Figura 22). Por lo tanto, la Fn no solo cumple una función de proteína amortiguadora del nivel intracelular de Fe (uniendo la diferencia del Fe incorporado a la célula y el transportado al plasma), sino es capaz de influir sobre el nivel de Fe que es transportado al plasma, cuando esta molécula presenta bajo contenido de Fe (Figura 28).

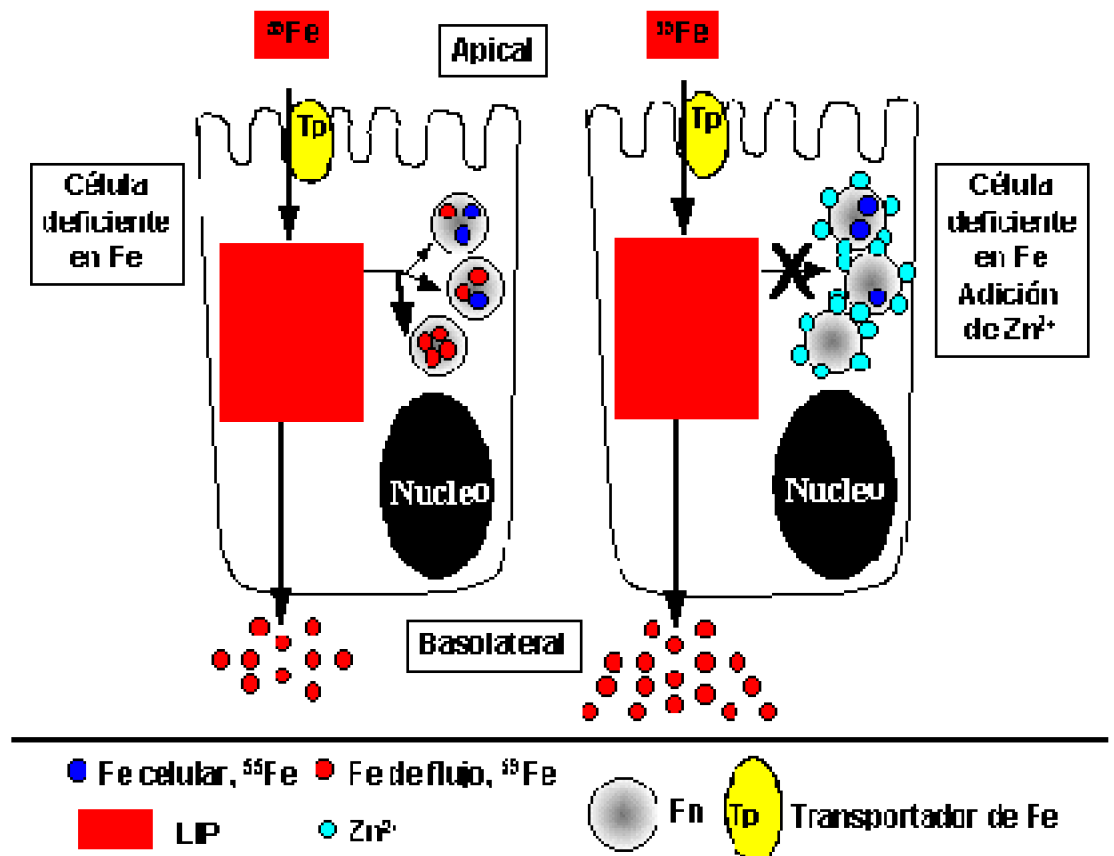


Figura . Modelo propuesto para la influencia de Fn en el flujo transepitelial de Fe en células deficientes. Efecto de la adición de Zn^{2+} . En células deficientes en Fe la Fn une parte del Fe de flujo incorporado a la célula. Al bloquear funcionalmente a la Fn, el Fe de flujo que no se incorpora a esta molécula, aumenta la población de Fe transportable.

Una posibilidad alternativa, era que al cultivar células a diferentes $[\text{Fe}]_i$, éstas presentarían diferentes estados de óxido-reducción, produciéndose desbalance oxidativo a $[\text{Fe}]_i$ altos. Dado que se ha descrito que es posible movilizar Fe desde la Fn a través de sistemas generadores de radicales libres (Biernacki y col, 1986), este Fe movilizado podría incorporarse al LIP y disminuir la incorporación de Fe de flujo a las células y el transporte transepitelial de este ión.

Los resultados presentados en esta tesis indican que el protocolo utilizado para obtener células equilibradas a diferentes $[\text{Fe}]_i$, no induce un desbalance oxidativo, así estas células no presentan diferencias en la relación GSH/GSSG (parámetro ampliamente aceptado como indicador del estado de óxido-reducción celular (Chance y

col, 1979)), Tabla 4. Este resultado, aparentemente paradójico, es explicado por un aumento en las actividades GSH-Px y GSSG-Rd (Tabla 5). Al aumentar la actividad GSH-Px, las células se encuentran mejor preparadas para enfrentar el riesgo de toxicidad que significa una sobrecarga de Fe, la cual sin este proceso de adaptación podría generar importantes cantidades de radicales libres de alta toxicidad a nivel celular (Chance y col, 1979; Clemens y Waller, 1987). Por otra parte, dado que GSH es sustrato para la GSH-Px, al aumentar esta actividad debería disminuir el nivel de GSH y con esto la relación GSH/GSSG, sin embargo esto no se observa en el sistema celular utilizado (Tabla 4), dado que las células aumentan también la actividad GSSG-Rd (Tabla 5), con lo cual, recuperan el nivel de GSH gastando NADPH el cual es obtenido desde el ciclo de las pentosas fosfato. Se ha descrito que las células Caco-2 presentan un ciclo de las pentosas fosfato muy activo (Baker y Baker, 1993), por lo tanto el gasto de NADPH debido al aumento de actividad GSSG-Rd puede no implicar desbalances para este sistema celular. Además se ha descrito que sistemas generadores de radicales libres pueden movilizar Fe desde la Fn (Biemond y col, 1986), lo cual podría aumentar el LIP y de esta manera disminuir la incorporación de Fe de flujo y su transporte transepitelial. Los resultados descritos en esta tesis indican que la preincubación de las células cultivadas a $[Fe]_i$ 75 μ M con t-butOOH aumenta transientemente la salida de Fe desde las células al espacio basolateral (Figura 23) y disminuye la incorporación de Fe de flujo a las células y su flujo transepitelial (Figura 24). Este último resultado podría ser interpretado en base a trabajos que describen un requerimiento de sustancias antioxidantes, las cuales serían liberadas al espacio basolateral para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} antes de ser incorporado (Nunez y col, 1994; Han y col, 1995). La preincubación con t-butOOH puede disminuir los equivalentes reductores desacelerando este proceso. El aumento del flujo célula-basolateral, podría deberse a una menor unión del Fe celular por parte de Fn u otros componentes que unan este ión, en presencia de sustancias oxidantes como t-butOOH. El resultado descrito en la Figura 25, indica que el Fe de flujo es incorporado a un menor grado en las proteínas que unen Fe cuando el flujo de este ión ha sido realizado en presencia de t-butOOH. Sin embargo, el nivel de Fe de flujo unido a Fn es el menos afectado, sugiriendo que en este sistema celular la influencia de un desbalance oxidativo sobre la absorción de Fe se produciría a través de proteínas diferentes a Fn. Tanto Cr como P70 disminuyen su capacidad de unir Fe a menos del 50 %, en presencia de t-butOOH, lo cual concuerda con la disminución tanto de la incorporación de Fe a las células, como de su flujo transepitelial. Este resultado permite postular que estas proteínas presentan un papel importante en la unión y destinación del Fe recientemente incorporado a las células.

5. CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados presentados en esta tesis se concluye que:

1. En células Caco-2, la ferritina cumple la función de almacenar Fe, que se ha descrito para esta molécula tanto en células intestinales, como en células del resto del organismo.

2. La ferritina libre en el citosol, presenta una alta proporción de una sub-unidad de 23 kDa, la cual concuerda con el PM reportado para la sub-unidad H. Esta ferritina citosólica parece estar vinculada al manejo de Fe de flujo.

3. La ferritina une de Fe de flujo en relación inversa a su grado de saturación. Así, su influencia en este proceso es más notable a baja $[Fe]_i$, donde une hasta un 25 % del total del Fe recientemente incorporado a las células. Otras proteínas como Cr y una P70 podrían tener papeles más importantes que ferritina en este proceso, ya que en estado de deficiencia de Fe Cr une hasta un 30 % y P70 hasta un 50 % del Fe recientemente incorporado a las células. De esta forma, P70 y Cr podrán ser intermediarios cinéticos en la incorporación de Fe en ferritina.

4. El bloqueo funcional de la ferritina, mediante la adición de Zn^{2+} , comprueba que la ferritina puede unir Fe recientemente incorporado y disminuir el pool de Fe que es transportado al plasma. El bloqueo de la ferritina por adición de Zn^{2+} aumenta el flujo transepitelial de Fe hasta en un 48 % en células en estado de deficiencia de Fe. Estos datos indican que ferritina regula el flujo transepitelial de Fe a baja saturación con Fe.

5. Las células Caco-2 cultivadas en condiciones de sobrecarga de Fe, presentan una

población de Fn en un compartimento vesiculado. Este compartimento, presenta una distribución perinuclear y contiene ferritina constituida por sub-unidades de 23 y 18 kDa. Si bien, la sub-unidad menor podría corresponder a la sub-unidad tipo L (20-22 kDa), la corta T_{1/2} de esta ferritina y la observación de que esta contenida en un compartimento que cofracciona con actividad enzimática marcadora de lisosomas, sugiere que podría corresponder al producto de degradación lisosomal de la ferritina llamado hemosiderina (PM: 18 kDa). De ser así, se deduce que la ferritina más altamente saturada con Fe alcanza en forma preferente en compartimento lisosomal.

6. Un desbalance oxidativo puede disminuir tanto la incorporación como el flujo transepitelial de Fe en células Caco-2. Sin embargo, no afecta de manera importante la unión de Fe de flujo por parte de Fn. Este desbalance oxidativo disminuye la unión de Fe flujo por parte de Cr y P70 en un 50 %, permitiendo postular que estas proteínas presentarían un papel más importante que ferritina, en la unión y destinación de Fe.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Hernandez, X, Nichols, GM and Glass, J 1991. Caco-2 cell line: a system for studying iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1070:205-208.
- Anderberg EK, Artursson P. 1993. Epithelial transport of drugs in cell culture. VIII: Effects of sodium dodecyl sulfate on cell membrane and tight junction permeability in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.* 82:392-8.
- Andrews, SC, Treffry, A and Harrison, PM 1987. Siderosomal ferritin. The missing link between ferritin and haemosiderin? *Biochem. J.* 245: 439-446.
- Arredondo, M, Orellana, A Garate, M and Nunez, MT 1997. Intracellular iron regulates iron absorption and IRP activity in intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Am. J. Physiol.* 273: G275-G280.
- Baker SS, Baker RD Jr 1993. Caco-2 cell metabolism of oxygen-derived radicals. *Dig. Dis. Sci.* 38:2273-80.
- Ball, C 1966. Estimation and identification of thiols in rat spleen after cysteine or glutathione treatment: relevance to protection against nitrogen mustards. *Biochem. Pharmacol.* 15: 809-816.
- Beard, JL, Dawson, H and Pinero, DJ 1996. Iron Metabolism : a comprehensive Review. *Nutr. Rev.* 54 : 295-317.
- Bernt, E and Bergmeyer, HU. 1984. Estimation of Oxidized glutathione level in rat

- tissues. *Methods of enzymatic Analysis* 4: 1643-1647.
- Biederbick, A, Kern, HF and Elsasser, HP. 1995. Monodansylcadaverine, (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur. J. Cell. Biol.* 66: 3-14.
- Biemond, P, Swaak, A, Beindorff, C and Koster, J 1986. Superoxide-dependent and independent mechanism of iron mobilization from ferritin by xanthine oxidase. *Biochem. J.* 239:169-173.
- Boveris, A and Cadenas, E 1982. Production of superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. En: *Superoxide Dismutase. Vol. II* (Oberley, L.W., ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 15-30.
- Bridges, KR 1987. Ascorbic acid inhibits lysosomal autophagy of ferritin. *J. Biol. Chem.* 262: 14773-14778.
- Cairo, G, Tacchini, L, Pogliaghi, G, Anzon, E, Tomasi, A and Bernelli-Zazzera, A 1995. Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 270:700-703.
- Carlsson, P and Bjursell, G 1989. Negative and positive promoter elements contribute to tissue specificity of apolipoprotein B expression. *Gene* 77:113-121.
- Cellier M, Belouchi A and Gros P 1996. Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of Nramp. *Trends Genet.* 12:201-204.
- Chance, B, Sies, H and Boveris, A 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59:527-605
- Clemens, MR and Waller, HD 1987. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chemistry and Physics of Lipids.* 45:251#268.
- Conrad, ME, Umbreit, JN, Moore, EG, Peterson, RDA and Jones, MB 1990. A newly identified iron binding protein in duodenal mucosa of rats: purification and characterization of mobilferrin. *J. Biol. Chem.* 265:5273-5280.
- Conrad, ME, Umbreit, JN, Peterson, RDA, Moore, EG and Harper, KP 1993a. Function of integrin in duodenal mucosal uptake of iron. *Blood* 81:517-521.
- Conrad, ME, and Umbreit, JN 1993b. A concise review: Iron absorption, the mucin-mobilferrin-integrin pathway. *Am. J. Hematol.* 42:67-73.
- Conrad, ME, Umbreit, JN and Moore, EG 1993c. Rat duodenal iron binding protein mobilferrin is a homologue of calreticulin. *Gastroenterology* 104:1700-1704.
- Cox, PG, Harvey, NE, Sciortino, C and Byres, BR 1981. Electron-microscopic and radioiron studies of iron uptake in newborn rat myocardial cells in vitro. *Am. J. Pathol.* 102: 151-159.
- Crichton, RR and Ward, RJ 1992. Iron metabolism-New perspectives in view. *Biochemistry.* 31:11255-11264.
- Deutscher SL, Creek KE, Merion M, Hirschberg CB 1983. Subfractionation of rat liver Golgi apparatus: separation of enzyme activities involved in the biosynthesis of the phosphomannosyl recognition marker in lysosomal enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3938-42.
- Diponkar, R, Flanagan, P, Cluett, J and Valberg, L 1986. Transferrin receptors in the human gastrointestinal track. *Gastroenterology* 91:861-865.
- Engvall, E and Perlman, P 1971. Enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA)

- quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-879.
- Fairweather-Tait, SJ, Swindell, TE and Wright, JA. 1985. Further studies in rats on the influence of previous iron intake on the estimation of bioavailability of Fe. *British J. Nutr.* 54: 79-86.
- Feder, J, Gnirke, A, Thomas, W, Tsuchihashi, Z, Ruddy, D, Basava, A, y col (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics.* 13: 399-408.
- Feder, J, Penny, D, Irrinki, A, Lee, V, Lebron, J y col (1998) The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 1472-1477.
- Finley, JW, Briske-Anderson, Reeves, PG and Johnson, LK. 1995. Zinc uptake and transcellular movement by Caco-2 cells: studies with media containing fetal bovine serum. *J. Nutr. Biochem.* 6: 137-144.
- Flanagan, PR 1989. Mechanisms and regulation of intestinal uptake and transfer of iron. *Acta Pediatr. Scan. Suppl.* 361:21-30.
- Fleming MD, Trenor CI, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC 1997. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet.* 16:383-386.
- Forman, H and Boveris, A 1982. Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. En *Free Radicals in Biology.* Vol. V (Pryor, W.A., Ed.) Academic Press New York. p. 65-90.
- Gershoni, JM and Palade, GE 1982. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal. Biochem.* 124: 396-405.
- Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P. 1997. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J. Exp. Med.* 185:717-30
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hedlger MA 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388:482-488.
- Haile, DJ, Hentze, MW, Rouault, TA, Hartford, JB and Klausner, RD 1989. Regulation of interaction of the iron-responsive element binding protein with iron-responsive RNA elements. *Mol. Cell. Biol.* 9:5055-5061.
- Haile, DJ, Rouault, TA, Hartford, JB, Kennedy, MC, Blondin, GA, Beinert, H and Klausner, RD 1992. Cellular regulation of the iron responsive element binding protein. Disassembly of the cubane iron sulfur cluster results in high affinity RNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:7536-7540.
- Han, O., Failla, ML, Hill, AD, Morris, E and Smith, JC. 1994. Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by human intestinal cell line. *J. Nutr.* 124 :580-587.
- Han O, Failla ML, Hill AD, Morris ER, Smith JC Jr. 1995. Reduction of Fe(III) is required for uptake of nonheme iron by Caco-2 cells. *J Nutr* 125:1291-9
- Harrison, P, Clegg, G and May, K 1980. Ferritin structure and function. En *Iron in*

- Biochemistry and Medicine, II. Jacobs, A. and Worwood, M. (Eds.). Academic Press London and New York. London, Great Britain. p. 131-166.
- Harrison, PM 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage functions and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1275: 161-203.
- Hemler, M and Lands, W 1980. Evidence for a peroxide initiated free radical mechanism of prostaglandin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 255:6253.
- Hernandez-Yago, J, Knecht, E, Martinez-Ramon, A and Grisolia, S 1980. Autophagy of ferritin incorporated into the cytosol of Hela cells by liposomes. *Cell Tissue Res.* 205: 303-309.
- Hidalgo, I, Raub, T and Borchardt, R 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96:736-739.
- Hoy, TG and Jacobs, A 1981. Ferritin polymers and the formation of haemosiderin. *Br. J. Haematol.* 49: 593-602.
- Huebers, H, Huebers, E, Rummel, W and Crichton, RR. 1976. Isolation and characterization of iron-binding proteins from rat intestinal mucosa. *Eur. J. Biochem.* 66:447-455.
- Hughes TE, Ordovas JM, Schaefer EJ. 1988. Regulation of intestinal apolipoprotein B synthesis and secretion by Caco-2 cells. Lack of fatty acid effects and control by intracellular calcium ion. *J Biol Chem* 263:3425-31.
- Hughson, EJ, and Hopkins, CR 1990. Endocytic pathways in polarized Caco-2 cells. Localization of a compartment accessible from both apical and basolateral surfaces. *J. Cell. Biol.* 110:337-348.
- Iancu, TC 1990. Biological and ultrastructural aspects of iron overload: an overview. *Pediatr. Pathol.* 10: 281-296.
- Ishikawa, T, Akerboom, TPM and Sies, H 1986. Role of key defense systems in target organ toxicity. In: *Target Organ Toxicity* (Cohen, GM, Ed.) CRC Press. Boca Raton: Florida, vol. 1, pp. 129-143.
- Johnson, G, Jacobs, P and Purves, LR. 1983. Iron Binding proteins of iron-absorbing rat intestinal mucosa. *J. Clin. Invest.* 7: 1467-1476.
- Klausner, RD, Rouault, TA, and Hartford, JB 1993. Regulating the fate of RNAm: the control of cellular iron metabolism. *Cell* 72:19-28.
- Klebanoff, S 1975. Antimicrobial mechanism in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Seminars in Hematology* XII, 117.
- Korge, P and Campbell, K 1993. The effect of changes in iron Redox State on the activity of enzymes sensitive to modification of SH groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 304:420-428.
- Laemmli, UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lebron, J, Bennett, M, Vaughn, D, Chirino, A, Snow, P, Mintier, G y col (1998) Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell.* 93: 113-123.

- Lee DM, Dashti N, Mok T. 1988. Apolipoprotein B-100 is the major form of this apolipoprotein secreted by human intestinal Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*;156:581-7.
- Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J.W., Fowler, S. And De Duve, C. 1968. The large scale separation of peroxisomes, mitochondria and lysosomes from the livers of rat injected with triton WR-1339. *J. Cell. Biol.* 37: 482-512.
- Levander OA, DeLoach DP, Morris VC, Moser PB 1983. Platelet glutathione peroxidase activity as an index of selenium status in rats. *J Nutr* 113(1):55-63
- Levi, S, Santambrogio, P, Cozzi, A, Rovida, E, Corsi, B, Tamborini, E, Spada, S, Albertini, A and Arosio, P 1994. The role of L-chain in ferritin iron incorporation. Studies of homo and heteropolymers. *J. Mol. Biol.* 238:649-654.
- Linder, MC, Munro, HN 1977. The mechanism of iron absorption and its regulation. *Fed. Proc.* 36:2017-2023.
- Mahraoui L, Rousset M, Dussaulx E, Darmoul D, Zweibaum A, Brot-Laroche E. 1992. Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine, and colon. *Am J Physiol.* 263:G312-8
- May, P and Williams, D 1980. The inorganic chemistry of iron metabolism. En *Iron in Biochemistry and Medicine, II.* Jacobs, A and Worwood, M (Eds.). Academic Press London and New York. London, Great Britain. p. 1-26
- McCay, PB, Brueggemann, G, Lai, EK and Powell, SR 1989. Evidence that alpha-tocopherol functions cyclically to quench free radicals in hepatic microsomes. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 570:32#45.
- Meneghini, R 1997. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 23: 783-792.
- Meunier V, Bourrie M, Berger Y, Fabre G. 1995. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol* 11:187-94
- Michalak, M, Milner, RE, Burns, K and Opas, M 1992. Calreticulin. *Biochem. J.* 285:681-692.
- Muir, WA, Hopfer, U, King, M 1984. Iron transport across brush border membranes from normal and iron deficient mouse upper intestine. *J. Biol. Chem.* 259:4896-4903.
- Mullner, EB, Rothenberger, S, Muller, AM and Khun, LC 1992. In vivo and in vitro modulation of the RNAm binding activity of iron regulatory factor. Tissue distribution and effects of cell proliferation, iron levels and Redox State. *Eur. J. Biochem.* 208:597-605.
- Niereder, W 1970. Ferritin: iron incorporation and release. *Experientia* 26:218-220.
- Nunez, MT, Alvarez, X, Smith, M, Tapia, V and Glass, J 1994. Role of redox systems on Fe^{3+} uptake by transformed human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Am. J. Physiol.* 267 (Cell Physiol. 36): C1582-C1588.
- Nunez, MT, Tapia, V and Arredondo, M 1996. Intestinal epithelia (Caco-2) cells acquire iron through the basolateral endocytosis of transferrin. *J. Nutr.* 126: 2151-2158.
- Ollinger, K and Roberg, K 1997. Nutrient deprivation of cultured rat hepatocytes

- increases the desferrioxamine-available iron pool and augments the sensitivity to hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 272: 23707-23711.
- Orimo, H, Hisayasu, S, Hirai, Y and Yoshino, Y 1994. The role of membrane-associated iron-binding complex in intestinal iron absorption in the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 40, 511-522.
- Paglia DE, Valentine WN 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158-69.
- Parmley, RT, Barton, JC, Conrad, ME 1985. Ultrastructural localization of transferrin, transferrin receptor and iron binding site on human placental and duodenal microvilli. *Br. J. Haemat.* 60:81-85.
- Plaa, G and Witschi, H 1976. Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 16:125.
- Ranaldi G, Islam K, Sambuy Y. 1992. Epithelial cells in culture as a model for the intestinal transport of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 36:1374-81.
- Richter, GW. 1984. Studies of iron overload. Rat liver siderosome ferritin. *Lab. Invest.* 50: 26-35.
- Romslo, I 1980. Intracellular transport of iron. En *Iron in Biochemistry and Medicine, II.* Jacobs, A. and Worwood, M. (Eds.). Academic Press London and New York. London, Great Britain. p. 325-355.
- Rossander-Hulten, L, Brune, M, Sandstrom, B, Lonnerdal, B and Hallberg, L 1991. Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 54:152-156.
- Rouault, TA, Hentze, MW, Caughman, SW, Harford, JB and Klausner, RD 1989a. Binding of a cytosolic protein to the iron-responsive element of human ferritin messenger RNA. *Science* 241:1207-1210.
- Rouault, TA, Hentze, MW, Haile, DJ, Harford, JB and Klausner, RD 1989b. The iron responsive element binding protein: purification of a regulatory RNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:5768-5772.
- Rouault, TA, Stout, CD, Kaptain, S, Hartford, JB and Klausner, RD 1991. Structural relationship between an iron regulated RNA binding protein (IRE-BP) and aconitase. Functional implications. *Cell* 64:881-883.
- Rouault, TA, Haile, DJ, Downey, WE, Philpott, CC, Tang, C, Samaniego, F, Chin, J, Paoul, I, Orloff, D Hartford, JB and Klausner, RD 1992. An iron-sulfur cluster plays a novel regulatory role in the iron responsive element binding protein. *BioMetals* 5:131-140.
- Selden, C, Owen, M, Hopkins, JM and Peters, TJ. 1980. Studies on the concentration and intracellular localization of iron proteins in liver biopsy specimens from patients with iron overload with special reference to their role in lysosomal disruption. *Br. J. Haematol.* 44: 593-603.
- Shah, D, and Shin, W-C 1994. The establishment of polarity and enhanced transcytosis of transferrin receptors in enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Drug Targ.* 2:93-99.
- Sies, H, Wahlander, A, Waydhas, C, Soboll, S and Habberle, D 1980. Functions of

- intracellular glutathione in hepatic hydroperoxide and drug metabolism and the role of extracellular glutathione. *Advances in Enzyme Regulation*. 18:303-320.
- Simpson, RJ and Peters, TJ 1984. Studies of Fe^{3+} transport across isolated intestinal brush border membrane of the mouse. *Biochim. Biophys. Acta* 772:220-226.
- Simpson, RJ, Raja, KB, Peters, TJ 1985. Fe^{3+} transport by brush border vesicles from normal and hypoxic mouse duodenum and ileum. *Biochim. Biophys. Acta* 814:8-12.
- Skikne, B, Whittaker, P, Cooke, A and Cook, J 1995. Ferritin excretion and iron balance in humans. *British J. Hematol.* 90:681-687.
- Snape, S and Simpson, RJ 1991. Iron binding to, and release from, the basolateral membrane of mouse duodenal enterocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1074:159-166.
- Sontheimer, RD, Nguyen, TQ, Cheng, S-T, Lieu, T-S, and Capra, D 1995. The unveiling of calreticulin. A clinical relevant tour of modern cell biology. *J. Invest. Med.* 43:362-369.
- Stein, C and Cheng, Y-C 1993. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents-Is the bullet really magical? *Science* 261:1004-1012.
- Tang, CK, Chin, J, Hartford, JB, Klausner, RD and Rouault, TA 1992. Iron regulates the activity of the iron responsive element binding protein without changing its rate of synthesis or degradation. *J. Biol. Chem.* 267:24466-24470.
- Tapia, V, Arredondo, M and Nunez, MT 1996. Regulation of iron absorption by cultured intestinal epithelia (Caco-2) cell monolayers with varied Fe status. *Am. J. Physiol.* 271: G443-G447.
- Thomas, C, Morehouse, L and Aust, S 1985. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 260:3275-3280.
- Towbin, H and Gordon, J 1984. Immunoblotting and dot Immunoblotting-current status and outlook. *J. Immunol. Meth.* 72: 313-340.
- Vidal, SM, Malo, D, Vogan, K, Skamene, E and Gros, P 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73: 469-485.
- Wheaby, MS and Crosby, WH 1963. The gastrointestinal track and iron absorption. *Blood* 22:416-428.
- Wien, EM and van Campen, DR. 1991. Ferric iron absorption in rats: relationship to iron status, endogenous sulfhydryl and other redox components in the intestinal lumen. *J. Nutr.* 121: 825-831.
- Wood, RJ and Han, O 1998. Recently identified molecular aspects of intestinal iron absorption. *J. Nutr.* 128: 1841-1844.
- Wrigglesworth, JM and Baum, H 1980. The Biochemical Functions of Iron. En *Iron in Biochemistry and Medicine, II*. Jacobs, A and Worwood, M (Eds.). Academic Press London and New York. London, Great Britain. p. 29-81.
- Yu, Y, Radisky, E and Leibold, EA 1992. The iron responsive element binding protein: purification, cloning and regulation in rat liver. *J. Biol. Chem.* 267:19005-19010.

APÉNDICE DE SOLUCIONES

Amido Black : Amido black 0,1 %, isopropanol 25 %, ácido acético 10 %.

Bloqueo electrotransferencia : leche descremada 5 %, en solución TBS-T.

Bloqueo ELISA leche descremada al 10% (p/v) en PBS-T.

Carbonato 0,05 M: Na_2CO_3 0,015 M; NaHCO_3 0,036 M, pH 9,6.

Electrotransferencia Glicina 0,2 M; Tris 25 mM, pH 8,3; metanol 20%; SDS 0,01%.

Fosfato-cítrico : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 102 mM, ácido cítrico 48 mM.

KH NaCl 0,9 %; KCl 0,046 %; KH_2PO_4 0,21 %; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,038 %; NaHCO_3 0,27 %; glucosa 0,09 %.

PBS : NaCl 0,15 M, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM, Na_2HPO_4 5 mM, pH 7,4.

PBS-T Tween 0,05% en PBS.

SM Sacarosa 0,25 M, MOPS 10 mM pH 7,4, MgCl_2 3 mM, glicerol 5%, DTT 1 mM e inhibidores de proteasas pepstatina A 0,7 mg/mL, aprótinina 0,5 mg/mL, leupeptina 10 mg/mL, PMSF 1 mM.

SM-Np40 Np40 0,05 % en SM.

SM-saponina Saponina 0,05 % en SM.

Sustrato de peroxidasa : OPDD 0,25 mg/ml, 250 ppm de H_2O_2 (30 vol) en solución fosfato-cítrico.

FERRITINA : ¿ELEMENTO REGULADOR DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE HIERRO ?

TBS : NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5.

TBS-T : Tween 20 0,2 % en solución TBS