



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE HEPCIDINA,  
FERROPORTINA Y FERRITINA EN EL  
PREACONDICIONAMIENTO HEPÁTICO CON  
HIERRO FRENTE A LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN  
HEPÁTICA.**

TESIS PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGO MÉDICO CON  
MENCION EN BIOANÁLISIS CLÍNICO, HEMATOLOGÍA Y BANCO DE SANGRE

AUTOR: Ángela Novoa Arce

TUTORES: Virginia Fernández A.

Luis Videla C.

Financiado por FONDECYT 1110006

**2014**

## Índice

<b>Tema</b>	<b>Página</b>
I-. Resumen	3-4
II-. Introducción	5-6
III-. Marco Teórico:	
- Isquemia reperfusión	6-9
- Preacondicionamiento hepático	9-10
- Preacondicionamiento hepático con Hierro	10-12
- Expresión hepática de hepcidina, ferroportina y ferritina	12-15
IV-. Hipótesis	16
V-. Objetivo general	16
VI-. Objetivos específicos	16
VII-. Materiales y Métodos	
- Animales	17
- Suplementación con fierro	17
- Modelo de Isquemia-Reperfusión hepática	17-18
- Obtención de muestras	18
- Obtención de cDNA	19
- Evaluación de la expresión de la Hpcidina	19
- Evaluación de la expresión de Ferroportina y Ferritina	20
- Determinación de la actividad de transaminasas séricas	20
- Análisis estadístico	
VIII-. Resultados	
- Niveles séricos de GOT y GPT	21-22
- Niveles de RNAm de Hpcidina	23-24
- Niveles de Ferritina	24-26
- Niveles de Ferroportina	26-28
IX-. Discusión	29-31
X-. Referencias Bibliográficas	32-35
XI-. Anexos	36

## **I.- Resumen**

El daño por isquemia-reperfusión (IR) es el que se produce luego de la interrupción del flujo sanguíneo a un órgano seguido del restablecimiento de éste, lo cual puede producir la muerte del hepatocito y de las células endoteliales. Se han estudiado diferentes estrategias de preconditionamiento (PC) hepático para proteger al hígado del daño causado por IR. Dentro de los mecanismos estudiados está el preconditionamiento inducido por hierro (Fe), molécula que establece una condición de estrés oxidativo transitorio que no desarrolla hepatotoxicidad. La homeostasis del Fe está regulada por la hepcidina, proteína de fase aguda sintetizada en el hígado, la cual en condiciones de exceso de Fe se encarga de proteolizar a la ferroportina con el fin de dejar internalizado al Fe dentro de la célula, aumentando la síntesis de ferritina y disminuyendo la ferremia. Por tal motivo se evaluó cambios en su expresión frente al PC hepático inducido por Fe, como también cambios en la expresión de ferroportina y ferritina, proteínas que regulan la ferremia. Se observó un aumento significativo en la expresión de hepcidina, inducido por la administración de Fe, como también un efecto inductor ejercido por la IR tanto en el grupo no P como en el P con Fe, sin diferencias significativas inducidas por la IR en la expresión de esta proteína en animales con o sin P. En concomitancia, se observó que el P con Fe incrementa significativamente la expresión de ferritina en el grupo sometido a IR. La expresión de ferroportina es también incrementada por el Fe, efecto que no se observa en el grupo sometido a IR. El incremento en la ferremia, gatillado por la administración de Fe, determinaría una mayor expresión de proteínas que participan en el metabolismo de este micronutriente, a fin de alcanzar la normalización de este parámetro sanguíneo. El aumento de ferritina, proteína que almacena Fe intracelular, disminuirá el pool de Fe lábil limitando

su toxicidad, y además, su actividad antioxidante asociada a su cadena pesada, contribuiría a la hepatoprotección gatillada por el P con Fe. Por otro lado, el exceso de Fe regula la expresión de la ferroportina, que actúa como exportador de Fe. La inducción de hepcidina por el protocolo de P con Fe, conlleva a la degradación (proteólisis) de ferroportina a fin de internalizar al Fe, el cual induce la síntesis de ferritina para disminuir la ferremia. Este estudio adicional muestra además que el efecto inductor ejercido por la IR sobre la expresión de hepcidina es exacerbado por la administración de Fe.

## II-. Introducción

En las cirugías hepáticas, uno de los grandes problemas es que los cirujanos se ven obligados a obstruir en forma parcial la circulación sanguínea durante la operación con el objeto de minimizar hemorragias. Este proceso, en el cual se produce la isquemia (I) hepática seguido del restablecimiento de la irrigación sanguínea o reperfusión (R), provoca daño celular asociado a inflamación y a estrés oxidativo, produciendo una injuria en dicho órgano, la cual puede llegar a ser irreversible, determinando el éxito o fracaso del procedimiento (1). Por esta razón se han diseñado procedimientos que permiten reducir el daño celular que sufre el hígado al ser sometido a cirugías bajo oclusión vascular, los que constituyen diferentes estrategias de preacondicionamiento hepático, proceso biológico endógeno que se manifiesta al exponer al hígado a una situación citotóxica que le otorgue protección frente a una futura lesión (1). En nuestro laboratorio se han evaluado estrategias preacondicionantes con potencial aplicación clínica, tales como la administración de hormona tiroidea, ácidos grasos poli-insaturados omega-3, y recientemente la administración subcrónica de hierro (Fe) (2). En este último caso, el protocolo de Fe usado gatilla estrés oxidativo hepático transiente, con activación de vías reguladas por factores de transcripción redox-sensibles, las que provocan hepatoprotección frente a la IR, con supresión de las respuestas pro-inflamatoria y pro-oxidante inducidas (3, 4). El preacondicionamiento con Fe incrementa la expresión de haptoglobina, proteína de respuesta de fase aguda hepática (3). En este sentido, se ha descrito que tanto la IR hepática como la administración aguda o dietaria de Fe aumentan significativamente la respuesta de fase aguda a través de la inducción de hepcidina, proteína antimicrobiana que

junto a ferroportina y ferritina regula la homeostasis del Fe, modulando su absorción almacenamiento y distribución tisular (5, 6). En el presente trabajo se evalúa el preacondicionamiento hepático con Fe frente a la IR, en relación a cambios en la expresión de hepcidina y de ferroportina y ferritina, proteínas asociadas a la función de hepcidina en la regulación de la homeostasis del Fe.

### **III-. Marco Teórico**

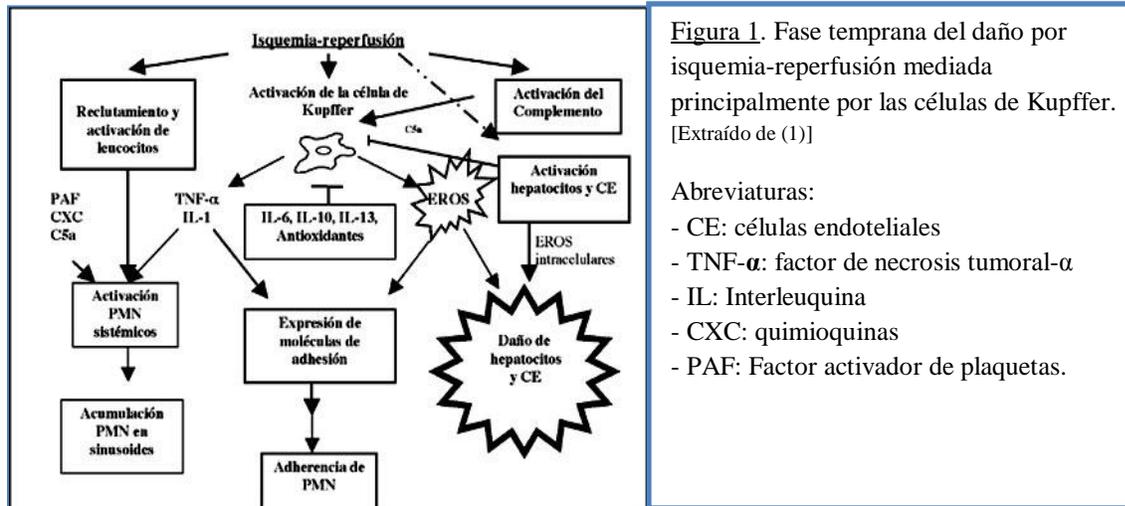
#### Isquemia-Reperfusión hepática.

La isquemia es un fenómeno que se produce al obstruir total o parcialmente la circulación sanguínea de un órgano o tejido, disminuyendo la entrega de oxígeno y nutrientes, pudiendo causar muerte celular, daño que se acentúa cuando se restablece el flujo de O<sub>2</sub> durante la reperfusión, conformando así el daño por isquemia-reperfusión (IR) (1). En el hígado el daño por IR está asociado a eventos tales como la resección quirúrgica bajo exclusión vascular, el trauma y el trasplante (1,7)

Al someter un órgano a una condición de isquemia, la hipoxia cambia el metabolismo celular de aerobio a anaerobio, disminuyendo la fosforilación oxidativa mitocondrial, la síntesis de ATP y la actividad de bombas de membranas dependientes de ATP, provocando la entrada de sodio, agua y calcio a la célula (8). El incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico activa diferentes sistemas enzimáticos hidrolíticos que dependen de este catión, como fosfolipasas, nucleasas y proteasas, los cuales participarán en la respuesta inflamatoria que se desarrollará posteriormente (7). Durante la IR se generan especies reactivas del oxígeno (EROS), vía (i) la transformación por proteasas

Ca<sup>+2</sup>-dependiente de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, que utiliza O<sub>2</sub> y genera anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al oxidar hipoxantina derivada del catabolismo del ATP a ácido úrico y (ii) la actividad NADPH oxidasa de los macrófagos hepáticos, las células de Kupffer (1).

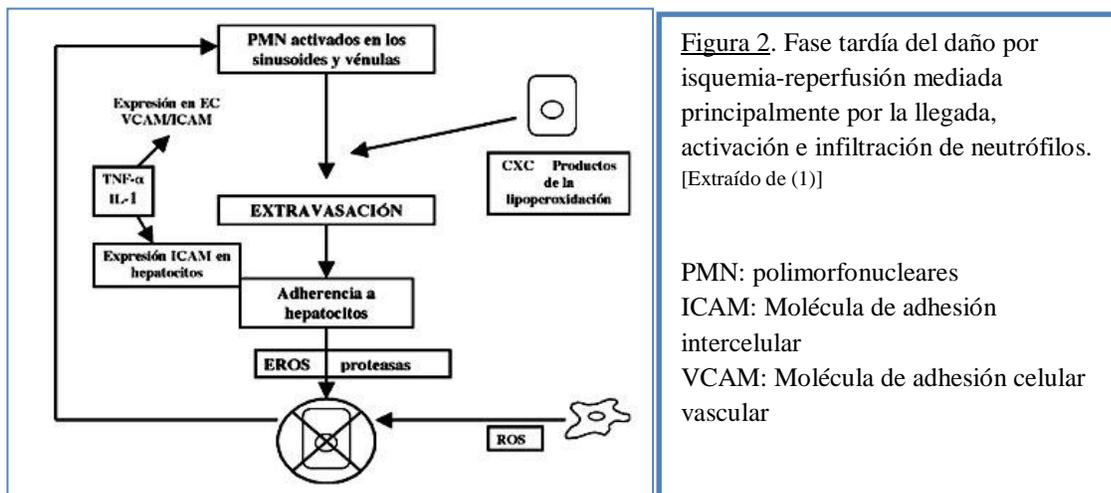
En el daño hepático secundario a IR se pueden caracterizar dos etapas. La primera, es la fase temprana, la cual se extiende desde el inicio de la reperfusión hasta 4 horas aproximadamente. En esta fase se observa la activación de las células de Kupffer con producción de EROS y de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleuquina (IL)-6 e IL-1. Además, habrá activación de los factores del complemento, así como reclutamiento y activación de linfocitos residentes (Figura 1) (1,9). La segunda etapa es la fase tardía, que dura mucho más que la temprana y abarca desde la sexta hasta las 24 horas posteriores a la reperfusión. Esta fase se caracteriza por la llegada, infiltración y activación de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN), lo cual permite mantener y amplificar el daño causado en la reperfusión temprana. Los responsables del reclutamiento de PMN son las citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y factores de crecimiento que se liberaron previamente (Figura 2). Si el daño endotelial es severo, la migración transendotelial de los PMN se ve facilitada, sin embargo si el daño no es grave dicha migración requiere de la participación de moléculas de adhesión como ICAM-1, cuya expresión aumenta en los hepatocitos en respuesta al TNF- $\alpha$ , IL-1 e interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) (1,9).



**Figura 1.** Fase temprana del daño por isquemia-reperfusión mediada principalmente por las células de Kupffer. [Extraído de (1)]

Abreviaturas:

- CE: células endoteliales
- TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral- $\alpha$
- IL: Interleuquina
- CXC: quimioquinas
- PAF: Factor activador de plaquetas.



**Figura 2.** Fase tardía del daño por isquemia-reperfusión mediada principalmente por la llegada, activación e infiltración de neutrófilos. [Extraído de (1)]

PMN: polimorfonucleares  
 ICAM: Molécula de adhesión intercelular  
 VCAM: Molécula de adhesión celular vascular

Existen dos tipos de isquemia hepática, isquemia caliente e isquemia fría. (i) La isquemia caliente, en la cual la temperatura del hígado se mantiene similar a la temperatura corporal ocurre en cirugías hepáticas bajo oclusión, trauma hepático, y shock hipovolémico, determina muerte de los hepatocitos y de las células endoteliales sinusoidales (SEC) (2,9). (ii) La isquemia fría, condición que se observa en un trasplante de hígado, se desarrolla con el órgano fuera del organismo, a 4 °C con el objetivo de enlentecer el metabolismo del

órgano al máximo antes de ser implantado (7). Este tipo de isquemia también conduce a la muerte de las SEC (9).

### Preacondicionamiento hepático

El preacondicionamiento (PC), proceso biológico endógeno que tiene como objetivo aumentar la tolerancia de un órgano frente a una futura lesión, se manifiesta al exponer al hígado a una situación citotóxicamoderada que le otorgue protección frente a una condición deletérea posterior, como la IR (1, 9).

El primer estudio de PC, realizado por Murry en corazón, consistente en aplicar breves y repetitivos períodos de isquemia, seguidos de reperfusión, breves períodos de isquemia, seguidos de reperfusión previo a una IR prolongada (10). Luego se constató que este mecanismo de PC isquémico se podía aplicar a otros órganos, dentro de ellos, el hígado. La protección que otorga el PC isquémico varía según el órgano en el cual se aplique. En el hígado la protección se obtiene luego de aplicar un ciclo de 10 minutos de isquemia seguido de 10 minutos de reperfusión, sin que la adición de nuevos períodos de IR proporcione mayor protección (11).

Dentro de las nuevas estrategias de PC evaluadas en modelos experimentales de lesión hepática por IR se encuentran, (i) la terapia génica, dirigida a la regulación de proteínas que participan en la producción de EROS, en la apoptosis, en la activación del factor nuclear  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B) o en la regulación de moléculas como ICAM-1 y P-selectinas que reducen el reclutamiento de neutrófilos, y (ii) el uso de agentes farmacológicos que inhiben mecanismos deletéreos o reducen el estrés oxidativo, iniciando una vía de defensa celular (2, 9, 12).

Las estrategias farmacológicas no se han utilizado en clínica debido a la aparición de efectos adversos y/o por no lograr dosis adecuadas para conseguir la protección (12). Aunque el PC fue útil en resecciones y trasplantes de hígado humano, el uso de este método aún es controversial. Por todas esas razones, se ha hecho necesaria la búsqueda de nuevas estrategias de PC hepático aplicables en la clínica. Por tal motivo, en nuestro laboratorio se han realizado procedimientos experimentales en ratas para evaluar estrategias precondicionantes con potencial aplicación clínica, tales como la administración de hormona tiroídea, ácidos grasos poli-insaturados omega-3, y recientemente la administración subcrónica de hierro (Fe), todos los cuales inducen hepatoprotección asociada a la inducción de estrés oxidativo moderado (2, 13).

#### Preacondicionamiento hepático con Hierro

El Fe es un micronutriente esencial en todos los organismos vivos. En soluciones acuosas puede estar en estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) o férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), propiedad que le permite participar en procesos de óxido-reducción (14), tales como los que controlan el flujo de electrones o en vías bioenergéticas, la síntesis de DNA y el aporte de oxígeno a los tejidos (2, 3). Entre las hemoproteínas que utilizan Fe como cofactor se encuentran las que participan en el metabolismo del oxígeno (oxidasas, peroxidasas, catalasas e hidroxilasas), en la transferencia de electrones (citocromos) y en el transporte de oxígeno (hemoglobina) (14).

El potencial redox elevado y su capacidad para generar radicales hidroxilo ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) que pueden causar peroxidación de las membranas lipídicas y otros constituyentes celulares, convierten al Fe en una molécula altamente tóxica en elevadas concentraciones. Por otro lado, el déficit de este metal produce anemia (15). Esta propiedad es denominada

efecto hormético, lo que quiere decir que su efecto varía según su concentración (3). El Fe cataliza la conversión del  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  en  $HO^{\cdot}$  mediante las reacciones de Fenton y Haber Weiss, lo que produce un aumento del estrés oxidativo (EOx) celular (16). El hierro en el organismo forma parte de dos compartimientos, uno funcional en el cual encontramos diversos compuestos, como la hemoglobina, la mioglobina, la transferrina y las enzimas que utilizan Fe como cofactor o grupo prostético, y el compartimiento de depósito, en el cual encontramos a la ferritina y a la hemosiderina, que forman las reservas corporales de éste metal (14,15).

El Fe es transportado por transferrina (Tf), proteína plasmática que facilita el intercambio del metal entre los compartimientos intra y extracelular (14). Aunque el Fe intracelular está fuertemente unido a ferritina y otras proteínas, una fracción menor es unido y quelado débilmente a moléculas de bajo peso molecular, para poder pasar con facilidad a través de la célula, constituyendo el pool de Fe lábil (LIP) el cual puede promover la generación de EROS y así desarrollar EOx intracelular (2, 3). El pool de hierro lábil debe estar en equilibrio con el Fe proveniente de la dieta, con el hierro de exportación, con la incorporación reversible de Fe a proteínas hemínicas y no hemínicas y con los depósitos de ferritina (2).

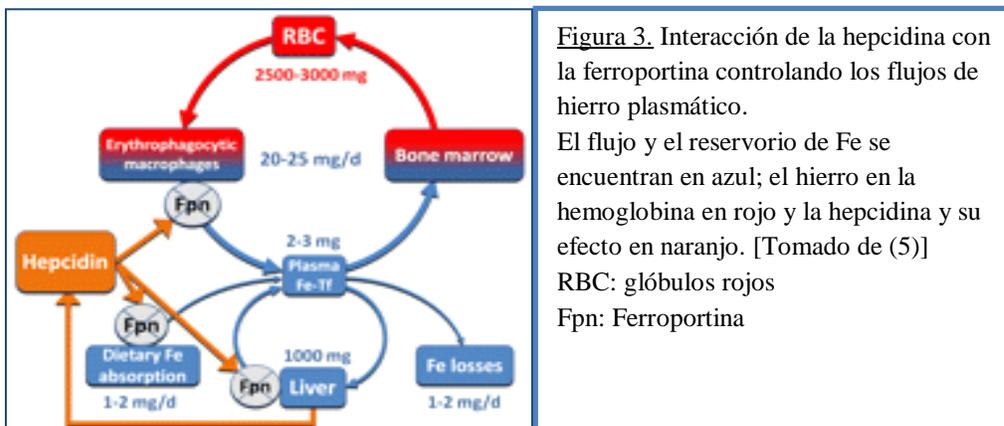
Estudios previos en hígado de rata señalan que la administración subcrónica de Fe (6 dosis de 50 mg/kg, en días alternados) precondiciona al hígado frente a la IR, mediante efectos anti-oxidantes y anti-inflamatorios, gatillados por la activación del NF- $\kappa$ B e incremento en la expresión de haptoglobina, proteína de respuesta de fase aguda hepática (3,4). Dicho estudio mostró además incrementos en el contenido total de Fe y en el LIP hepático, con la consiguiente sobreexpresión del contenido de ferritina, debido a la

sobrecarga de Fe administrado, lo cual establece una condición de EOX transiente que no desarrolla hepatotoxicidad (2,3). El EOX transiente, gatillado por Fe, puede incluir participación de las células de Kupffer, macrófagos residentes del hígado, cuya activación conlleva a la liberación de ROS que en presencia de Fe pueden desencadenar reacciones de Fenton y Haber Weiss, con posibles cambios en la expresión génica a través de la modulación de la actividad de NF- $\kappa$ B, y liberación de TNF- $\alpha$  seguido de la activación de señales citoprotectoras en hepatocitos con efectos hepatoprotectores frente a la IR (2,17). Además de la activación de la vía regulada por NF- $\kappa$ B, en nuestro laboratorio se ha descrito la activación temprana del factor de transcripción Nrf2 e incrementos en el contenido hepático de hemoxigenasa-1, eventos que podrían contribuir a la respuesta hepatoprotectora gatillada por Fe (18).

#### Expresión hepática de hepcidina, ferroportina y ferritina

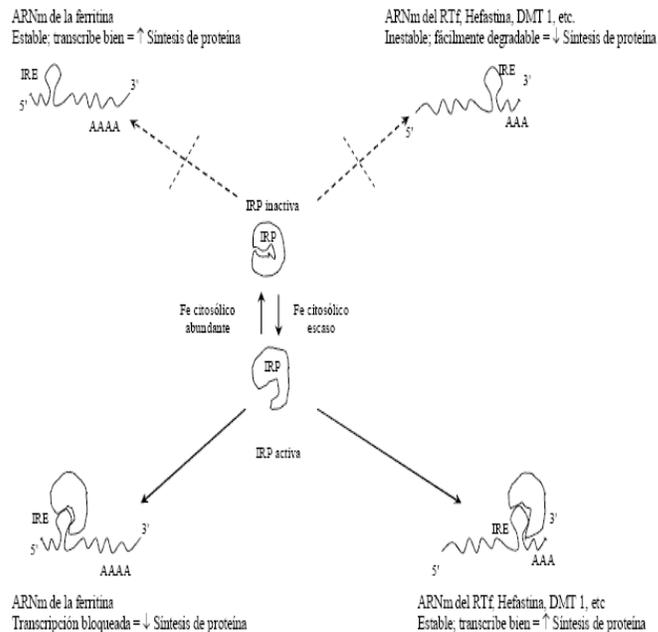
(i) Hepcidina: Es un péptido catiónico con 25 aminoácidos, rico en cisteína, y con 4 puentes disulfuros que unen 8 residuos de cisteína, importante para su acción antimicrobiana. Es una proteína de fase aguda hepática que participa en la homeostasis del Fe controlando su absorción intestinal, almacenamiento y distribución tisular (5). Para cumplir su función reguladora frente a una sobrecarga de Fe, la hepcidina interactúa con ferroportina (FNP1), un exportador de Fe, provocando la internalización y proteólisis de este transportador, secuestrando al Fe en hepatocitos, enterocitos y macrófagos, disminuyendo el Fe plasmático (5). La expresión de hepcidina está regulada por el nivel de Fe hepático y plasmático y por la demanda eritropoiética de Fe (Figura 3), observándose una correlación significativa entre los niveles de hepcidina y los de ferritina sérica, los cuales descienden al aumentar los niveles de hepcidina (5).

La síntesis de la hepcidina está inducida por la sobrecarga plasmática de Fe, por la infección y por la inflamación, y su síntesis disminuye en anemia e hipoxia (19). La regulación de la expresión de hepcidina por inflamación está dada por diferentes citoquinas inflamatorias. La IL-6 estimula la expresión de hepcidina vía STAT3, factor de transcripción redox sensible que interactúa con un elemento de unión de STAT3 en el promotor de la hepcidina, siendo la señalización de IL-6/STAT3 un efector clave de la expresión de la hepcidina en las enfermedades inflamatorias crónicas. Otras citoquinas y los efectos directos de moléculas microbianas en hepatocitos también pueden contribuir a la estimulación de esta proteína (19).



(ii) Ferroportina y Ferritina: La expresión de proteínas que participan en el metabolismo de Fe se regula traduccionalmente por el sistema IRP/IRE. Este sistema de regulación está compuesto por los elementos reguladores de hierro (IRE, “Iron Responsive Elements”) y por las proteínas reguladas por hierro (IRP, “Iron Regulatory Proteins”) (20). Los IRE son estructuras lazo-tallo que se localizan en las regiones 5' o 3' no traducidas de

los RNAm que codifican para las proteínas que intervienen en el metabolismo del Fe (21). Las IRP trabajan en conjunto con los IRE para monitorear y responder a los cambios en la cantidad de Fe en el LIP (Figura 4).



**Figura 4:** Representación esquemática de la regulación del metabolismo del hierro. [Extraído de (15)]

IRE: elemento de respuesta al hierro;  
 IRP: proteína reguladora de hierro; RTf : receptor de transferrina : DMT 1: Transportador de metales divalentes 1.

Cuando disminuye la cantidad de Fe en el LIP, las IRPs se unen a los elementos IREs, impidiendo la traducción de ferritina y ferroportina y se estabilizan los RNAm del receptor de transferrina y del DMT1, lo que se traduce en un aumento de captación de Fe (20).

La ferroportina (FNP1) también es conocida como Ireg1 (“Iron-Regulated Transporter 1”) y MTP1 (“Metal Transporter Protein”), es la única proteína exportadora de Fe en mamíferos (22). La localización de este transportador de Fe es consecuente con su función de exportación de Fe desde la célula (20), ya que se expresa principalmente en los enterocitos duodenales, células de Kupffer y macrófagos esplénicos (22). FNP1 se localiza en la membrana basolateral de los enterocitos duodenales y en el compartimiento

citoplasmático de células del sistema retículo endotelial (SER), donde tiene una distribución predominantemente basolateral (23). No obstante, puede encontrarse en el citoplasma basal y apical de estas células (21). En condiciones de sobrecarga de Fe, se sintetiza hepcidina, la cual se dirige al intestino delgado para unirse a la FPN1 y provocar su internalización y posterior proteólisis, dejando al Fe atrapado dentro del enterocito duodenal (19). Dentro de uno o dos días, los enterocitos senescentes se desprenden, eliminando así Fe del organismo (23).

El Fe que excede la formación de hemo proteínas (hemoglobina, mioglobina, entre otras), o proteínas con grupos Fe-S implicadas en la cadena respiratoria mitocondrial, es depositado o almacenado intracelularmente en ferritina o hemosiderina (agregados micelares de ferritina) en el SRE del hígado, bazo y médula ósea (24). Cada molécula de ferritina puede contener hasta 4.500 átomos de Fe, aunque normalmente tiene alrededor de 2.500 (15). Además de su función de almacenamiento, la ferritina ha sido identificada como mediador esencial de las acciones antioxidantes y de protección de NF- $\kappa$ B (25). El efecto antioxidante y citoprotector de NF- $\kappa$ B sería mediado por la cadena pesada de ferritina, proteína regulada en su expresión por dicho factor de transcripción (26).

Debido a la función de hepcidina, ferroportina y ferritina en la homeostasis del Fe, es importante evaluar su expresión en el preacondicionamiento hepático con Fe, frente a la IR, esperándose un aumento en estas proteínas hepáticas.

#### **IV-. Hipótesis**

El preacondicionamiento hepático con hierro frente a la isquemia-reperfusión incrementa la expresión de hepcidina, junto a la de ferritina y ferroportina, proteínas asociadas a la función de hepcidina con efectos citoprotectores.

#### **V-. Objetivo general**

Evaluar la expresión de hepcidina, ferroportina y ferritina en el preacondicionamiento hepático con hierro frente a la isquemia-reperfusión.

#### **VI-. Objetivos específicos**

- Evaluar parámetros de daño hepático mediante la determinación de niveles séricos de transaminasas en animales sometidos a preacondicionamiento hepático con hierro y en animales no sometidos a esta condición.
- Cuantificar la expresión de la hepcidina hepática mediante qPCR.
- Evaluar la expresión de la ferroportina hepática mediante RT-PCR.
- Evaluar la expresión de la ferritina hepática mediante RT-PCR.

## **.VII-. Materiales y Métodos**

### Animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 140-160 gramos (Bioterio Central, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile). Los animales usados en este estudio recibieron una dieta balanceada para roedores con niveles normales de hierro y agua *ad libitum*.

Los protocolos experimentales en animales y los procedimientos de los animales cumplieron con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, los cuáles fueron aprobados por el Comité de Bioética de la facultad de Medicina, Universidad de Chile (Protocolo No. CBA 0381 FMUCH).

### Suplementación con Fe

En el tiempo cero, los animales recibieron 6 dosis intraperitoneales (ip) de 50 mg de Fe-dextrano/kg, disuelto en solución salina, o volúmenes equivalentes de solución salina (controles). Fe-dextrano y vehículo fueron administradas cada dos días durante un lapsus de 10 días.

### Modelo de IR hepática

A las 72 horas después del tratamiento con Fe, las ratas se anestesiaron vía ip con 1 ml/kg de Zoletil (Zoletil 50; Virbac S/A, Carros, France) el cual está compuesto por clorhidrato de zolazepam (25 mg/ml) y clorhidrato de tiletamina (25 mg/ml).

La IR parcial (1 h de isquemia seguido por 20 h de reperfusión) se indujo mediante la oclusión temporal del suministro de flujo sanguíneo a los lóbulos medial y lateral izquierdo del hígado a través de un clip de Schwartz. El grupo de ratas que se utilizó como Sham(control) fueron sometidas a anestesia y laparotomía simulada.

Los grupos experimentales fueron ratas tratadas con solución salina y ratas tratadas con Fe, sometidas a una laparotomía simulada o bien a IR, constituyendo cuatro grupos experimentales:

- Salino-Sham

- Salino-IR

- Fe- Sham

- Fe-IR

#### Obtención de muestras

Las muestras de hígado se tomaron de los lóbulos medios al final del período de reperfusión y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para luego almacenarse en un refrigerador a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción cardiaca. Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas para obtener el suero, el cual se utilizó para evaluar transaminasas séricas.

### Obtención de cDNA

El total de RNA fue extraído del tejido hepático mediante RNeasy lipid tissue mini kit de Qiagen, utilizando 40 mg de tejido hepático. Este kit nos permitió extraer y además purificar el RNA. El RNA obtenido fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A partir del RNA extraído se realizó la síntesis de cDNA mediante un PCR utilizando el sistema de ThermoScript RT. El cDNA resultante se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  el cual fue utilizado para realizar los ensayos posteriores.

### Evaluación de la expresión de Hepcidina mediante qPCR

Se utilizaron primers específicos para la Hepcidina. Su cDNA será amplificado por PCR según las condiciones que van a ser estandarizadas en un equipo de qPCR Stratagene. El primer de sentido directo a que se utilizó fue (5'- TTCCCATATGCCTCTTCTG-3') mientras que el primer de reversa fue (5'- ACAAGGCTCTTGGCTCTCTATG -3').

### Evaluación de la expresión de Ferroportina y Ferritina mediante RT-PCR

Para la Ferroportina se utilizaron los siguientes primers: primer de sentido directo (5' - CCTGACCTCAGCAAATTCC-3') y el primer de reversa fue (5'- ACACTGCAAAGTGCCACATC-3'). Mientras que los primers para Ferritina fueron: primer de sentido directo (5'-CGTCAGAATTATTCCACCGAAG- 3') y primer en sentido inverso fue (5'- CTGACGAATCTGAGAGGTCATAG -3'). El programa usado en el termociclador fue:

-94°C por 4 minutos
-94°C por 30 segundos
-55,8°C por 30 segundos
-72°C por 1 minuto
-72°C por 10 minutos
-4°C ∞

### Determinación de la actividad de transaminasas séricas

Se evaluó la actividad sérica de transaminasa glutámica-oxaloacética (GOT) y transaminasa glutámica-pirúvica(GPT), las cuales se utilizarán como marcador de daño hepático, mediante el kit los kitsEnzyline® ALAT/GPT 20 Monoréactif IVD y Enzyline® ASAT/GOT 20 Monoréactif IVD (Biomerieux® 69280 Marcy l'Etoile. France).

### Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedios  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre los grupos experimentales se estimarán mediante ANOVA unifactorial, seguido de test de Newman-Keuls o t de Student, con un  $p < 0,05$  como diferencia significativa.

El tamaño muestral ( $n=3$ ) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$n = \frac{2x(Z_a + Z_b)^2 \times (DS^2)}{|d|^2}$$

Donde: - n: Tamaño muestral  
-  $Z_a$  y  $Z_b$ : Coeficientes de riesgo  
- DS: Desviación estándar  
- d: cambio del promedio

## VIII.-Resultados

### Niveles séricos de GOT y GPT

De las muestras de sangre obtenidas de los diferentes grupos experimentales, se obtuvo suero para la determinación de los niveles de transaminasas séricas, las cuales se utilizan como marcador de daño hepático. Los resultados obtenidos para la actividad sérica de las transaminasas se observan en la Figura 5 para GOT y 6 para GPT. Los resultados muestran que las ratas sometidas a IR, sin previo precondicionamiento hepático con Fe, produce una elevación en la actividad de transaminasas séricas GOT y GPT, alza que es significativa al compararla con los animales sometidos al control de operación simulada (salino-sham). El aumento significativo es de 7,2 y 12,9 veces ( $p < 0,05$ ) en las actividades séricas de GOT (fig. 5A) y GPT (fig. 5B), respectivamente, en relación al grupo salino-sham, lo cual indica que la IR gatilla daño hepático. Los valores séricos de ambas transaminasas obtenidas de ratas tratadas con Fe y sometidas a laparotomía simulada son similares a los obtenidos del grupo salino-sham. Los valores séricos de GOT y GPT de los animales sometidos a precondicionamiento con Fe y luego a IR, son semejantes a los de los animales de los grupos salino-sham y Fe-sham, lo cual indica que el Fe como tratamiento precondicionante inhibe el daño hepático, generando la hepatoprotección, ya que en las ratas precondicionadas con Fe los niveles de GOT y GPT disminuyen en forma significativa ( $p < 0,05$ ).

Figura 5A

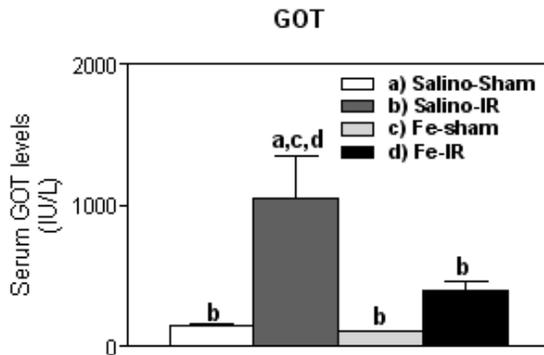


Figura 5B

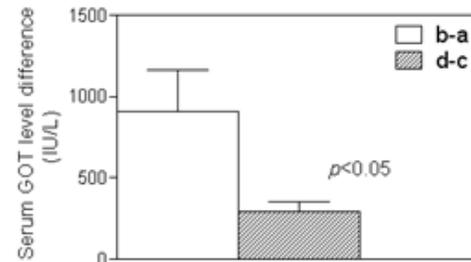


Figura 5: Actividad de la transaminasa sérica GOT. La actividad se expresa en unidades internacionales/litro (IU/l). La significancia de las diferencias entre los valores promedio de ratas control y sometidas a isquemia fue determinada por las pruebas de ANOVA unifactorial seguida del test de Newman-Keuls y se indican por las letras que identifican a cada grupo experimental. Figura 5A: Muestra los niveles de GOT obtenidos en los grupos salino-sham, salino-IR, Fe-sham, Fe-IR. Figura 5B: Muestra las diferencias en los niveles de GOT entre los grupos salino-sham/salino-IR (b-a) y Fe-sham/Fe-IR (d-c) con una significancia de  $p < 0,05$ .

Figura 6A

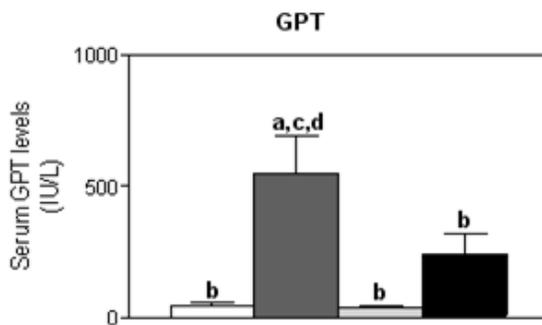


Figura 6B

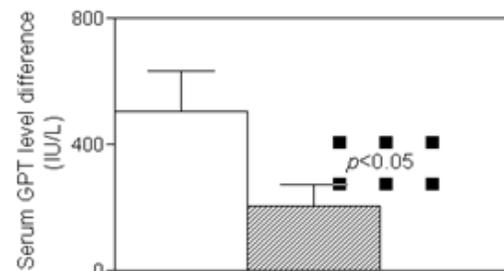


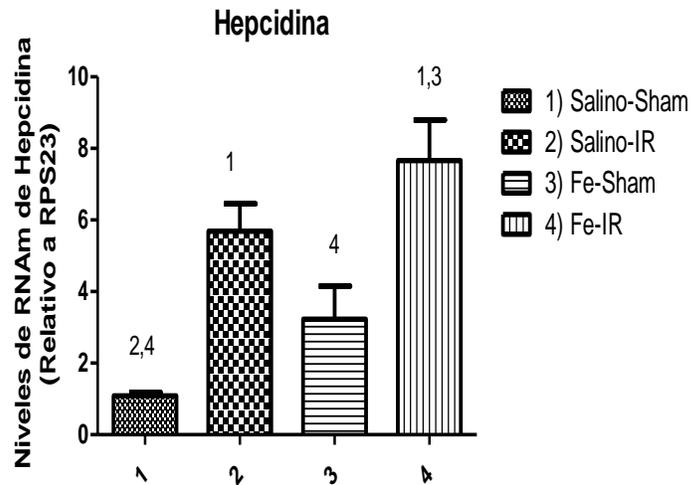
Figura 6: Actividad de la transaminasa sérica GPT. La actividad se expresa en unidades internacionales por litro (IU/l). La significancia de las diferencias entre los valores promedio de ratas control y sometidas a isquemia fue determinada por las pruebas de ANOVA unifactorial seguida del test de Newman-Keuls y se indican por las letras que identifican a cada grupo experimental. Figura 6A: Muestra los niveles de GPT obtenidos en los grupos salino-sham, salino-IR, Fe-sham, Fe-IR. Figura 6B: Muestra las diferencias en los niveles de GPT entre los grupos salino-sham/salino-IR (b-a) y Fe-sham/Fe-IR (d-c) con una significancia de  $p < 0,05$ .

### Niveles de RNAm de Hecpidina

La expresión de Hecpidina se cuantificó a través de la medición de los niveles de RNA mediante la técnica Q-PCR utilizando el programa MxPro.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7. En las muestras hepáticas de las ratas controles (salino-sham) se observó expresión constitutiva de RNAm de Hecpidina. Se puede apreciar que existe un aumento del nivel de RNAm de dicha proteína en todos los grupos (Fe-sham, Fe-IR y salino-IR) en comparación con los niveles obtenidos en las ratas control, siendo las ratas tratadas con precondicionamiento con Fe y luego sometidas a IR las que obtuvieron un mayor aumento de los niveles de RNAm de Hecpidina en comparación al grupo salino-sham, con un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) de 7,9 veces (fig. 7).

Se realizó el test ANOVA unifactorial seguido del test de Newman-Keuls que permite comparar los 4 grupos en estudio. Los grupos salino-IR y Fe-IR mostraron aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) de la expresión del RNAm de la hepcidina en comparación al grupo que no fue precondicionado ni sometido a laparotomía simulada, pero no hubo una diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) con el grupo Fe-Sham. Por otro lado, también se observa un incremento significativo en el grupo Fe-IR en comparación al Fe-Sham. No se observó diferencias significativas entre los siguientes grupos: Salino-Sham vs Fe-Sham, Fe-Sham vs Salino IR y entre Salino-IR vs Fe-IR. Todos estos datos nos indican que el aumento se produce en condiciones de IR y aumentan aún más cuando dicha condición se acompaña de un precondicionamiento hepático con Fe, pero el Fe por sí solo no es causal de que los niveles de RNAm de hepcidina se eleven.



**Figura 7.** Niveles de expresión de Hepcidina. Se muestran los niveles de RNAm de Hepcidina en hígado de ratas, relativo a RPS23 (Proteína ribosomal S23), determinados mediante la técnica de Q-PCR. Los valores muestran los promedios  $\pm$  SEM (n=3-4);  $p < 0,05$  indicado por los números que identifican a cada grupo experimental.

### Niveles de Ferritina

La expresión de Ferritina se determinó por medio de la medición de los niveles de RNA a través de la técnica de RT-PCR (fig. 8A).

Los valores obtenidos se muestran en la Figura 8A y 8B. Se realizó el test de ANOVA unifactorial seguido del test de Newman Keuls, el cual nos permite comparar los cuatro grupos en estudio. Las ratas tratadas con Fe como tratamiento precondicionante seguido de IR y las ratas que también fueron tratadas con Fe pero que fueron sometidas a laparotomía simulada obtuvieron aumentos estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) en los niveles de expresión de RNA de Ferritina de 5,3 veces y 5.0 veces, respectivamente, en comparación al grupo control (salino-sham), sin embargo no se observó diferencias significativas entre los niveles de ferritina del grupo salino-sham y salino-IR (fig. 8B).

Por otro lado, los valores de los niveles de expresión de RNA de ferritina de los grupos tratados con Fe, tanto el que luego fue sometido a IR (100%) como el que solo fue sometido a cirugía simulada (98%) obtuvieron un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de en comparación con el grupo salino-IR (60%) (fig.8B). Estos antecedentes indican que el precondicionamiento hepático con Fe es el causante del incremento en los valores de los niveles de expresión de RNA de ferritina.

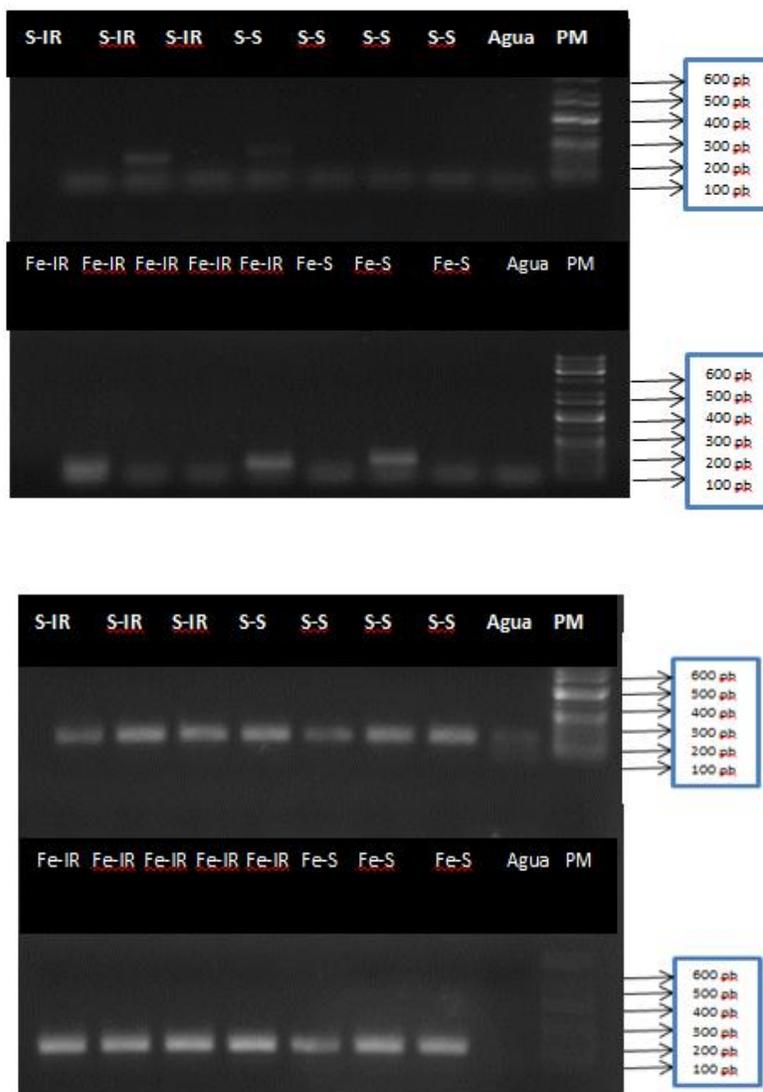


Figura 8A. RT-PCR del análisis de RNAm de los niveles de Ferritina. Los niveles fueron determinados en forma semicuantitativa mediante RT-PCR. La imagen de arriba corresponde a un gel de agarosa representativo de los productos de la electroforesis de ferritina (primer de 150 pb).

La imagen de abajo corresponde a un gel de agarosa representativo a los productos de la electroforesis con 18s (primer de 324 pb).

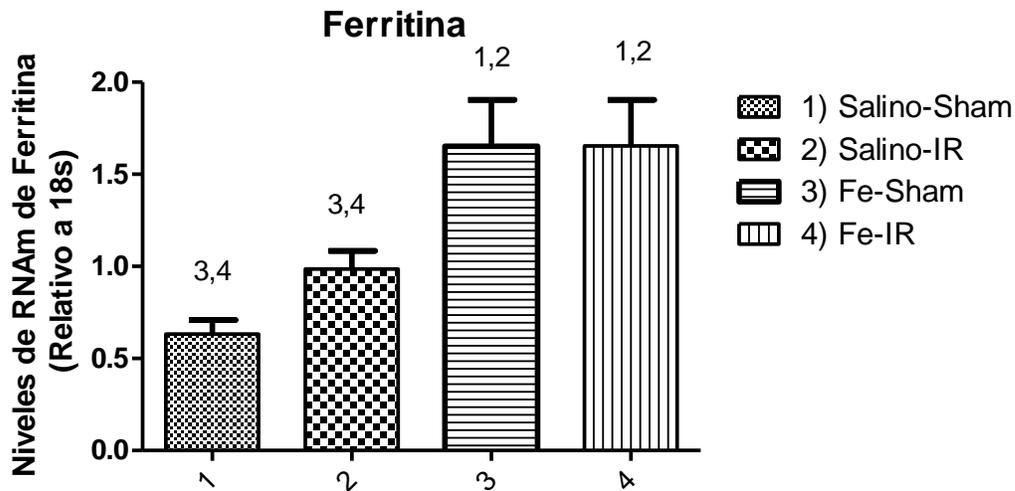


Figura 8B. Niveles de expresión de Ferritina. Se muestran los niveles de expresión de RNAm de Ferritina obtenidos en hígado de ratas mediante RT-PCR. Los gels de agarosa fueron fotografiados y digitalizados. Las densidades ópticas de las bandas de RNAm de Ferritina fueron normalizadas usando la densidad óptica de las bandas de RNAm de 18S. Los valores muestran los promedios  $\pm$  SEM (n=3-4).  $p < 0,05$  indicado por los números que identifican a cada grupo experimental.

### Niveles de Ferroportina

Los niveles de expresión de ferroportina fueron determinados mediante la medición de RNA mediante la técnica de RT-PCR (fig. 9A).

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 9A y 9B. Se puede observar que el grupo control presenta un alto nivel de de RNAm de ferroportina, lo cual nos habla de una expresión hepática constitutiva de dicha proteína. Se realizó el test de ANOVA unifactorial seguido del test de Newman-Keuls para comparar los 4 grupos en estudio. Los resultados indican que hay un aumento significativo en el valor de RNA de ferroportina de

las ratas sometidas a Fe como tratamiento precondicionante y sin realizarle IR posterior (Fe-sham), en comparación con los grupos salino-sham (25%), salino-IR (28%) o Fe-IR (22%).

Por el contrario, no se observó cambios significativos estadísticamente en los siguientes grupos: salino-IR vs Fe-IR, salino-IR vs Fe-sham y salino-sham vs Fe-IR. Estos resultados apuntan a que el aumento en la expresión de los niveles de RNAm de ferroportina son producidos por la administración de Fe.

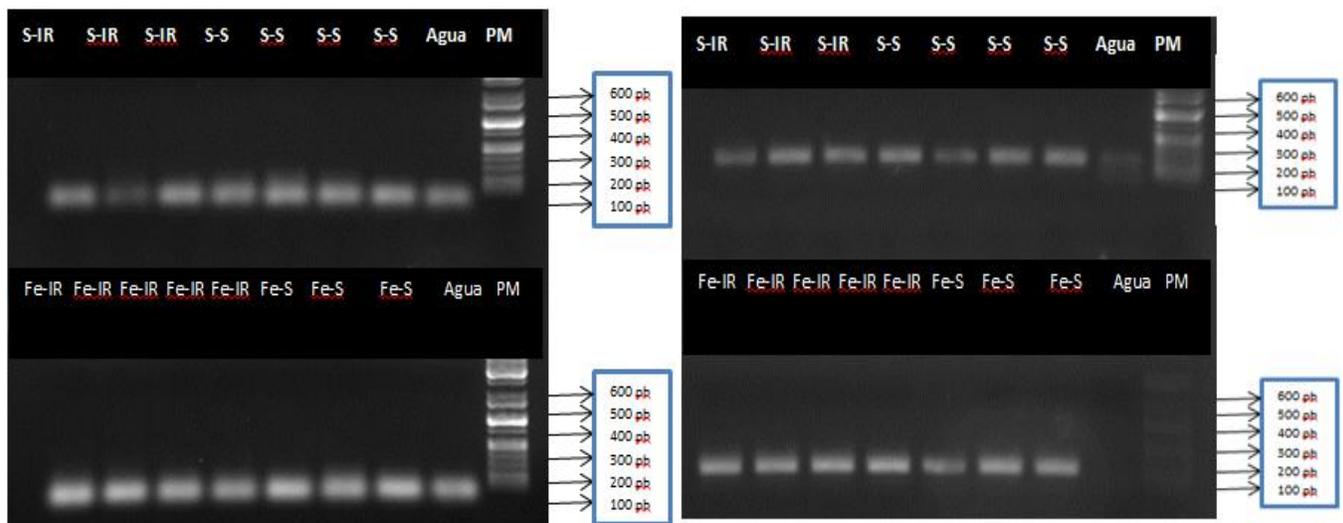


Figura 9A. RT-PCR del análisis de RNAm de los niveles de Ferroportina. Los niveles fueron determinados en forma semicuantitativa mediante RT-PCR. La imagen de la izquierda corresponde a un gel de agarosa representativo de los productos de la electroforesis de ferroportina (primer de 150 pb). La imagen de la derecha corresponde a un gel de agarosa representativo a los productos de la electroforesis con 18s (primer de 324 pb)

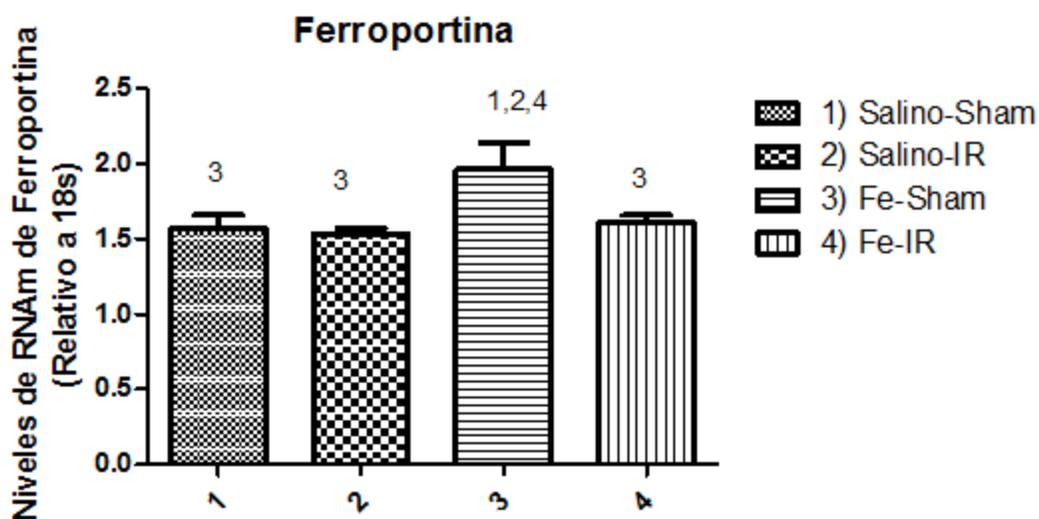


Figura 9B. Niveles de expresión de Ferroportina. Se muestran los niveles de expresión de RNAm de Ferroportina obtenidos en hígado de ratas mediante RT-PCR. Los gels de agarosa fueron fotografiados y digitalizados. Las densidades ópticas de las bandas de RNAm de Ferroportina fueron normalizadas usando la densidad óptica de las bandas de RNAm de 18S. Los valores muestran los promedios  $\pm$  SEM (n=3-4).  $p < 0,05$  indicado por los números que identifican a cada grupo experimental.

## **IX-. Discusión**

En el hígado el daño causado por IR constituye un problema clínico que afecta los resultados de las cirugías que se realizan bajo exclusión vascular y el pronóstico del trasplante del órgano. En este estudio se analizó el preacondicionamiento hepático con Fe frente a la isquemia-reperfusión (IR) y su efecto sobre diferentes preteínas relacionadas con el metabolismo del Fe: Hecpidina, Ferritina y Ferroportina. Para ello se utilizaron los siguientes grupos de experimentación: Salino-Sham, Salino-IR, Fe-Sham y Fe-IR. Se determinaron los niveles de actividad de las transaminasas séricas, GOT y GPT como marcador de daño hepático, además de determinar los niveles de RNAm de Hecpidina, Ferritina y Ferroportina en cada uno de los grupos nombrados.

Se observó que el preacondicionamiento con Fe otorga hepatoprotección contra la lesión hepática producida por IR, lo cual fue demostrado al medir los niveles de transaminasas (GOT y GPT) séricas, siendo el grupo sometido a IR sin previo tratamiento con Fe el que obtuvo alzas considerables, demostrando la existencia de daño hepático (4). Además, al hacer la misma medición en el grupo de ratas que fue sometido a preacondicionamiento con Fe seguido de una cirugía simulada (Fe-sham), se obtuvo que los niveles de la actividad de las transaminasas séricas similares a los del grupo control (salino-sham). La ausencia de efecto de la IR sobre las transaminasas séricas en ratas pretratadas con Fe comparado con los controles sugiere que el Fe como tratamiento preacondicionante inhibe el daño hepático, generando hepatoprotección, ya que en las ratas preacondicionadas con Fe los niveles de GOT y GPT disminuyen en forma significativa ( $p < 0,05$ ) en relación al grupo salino-IR.

Al administrar Fe como mecanismo precondicionante contra la IR, el organismo responde con alzas de las proteínas que participan en el metabolismo del Fe para así poder regular el aumento transitorio de la ferremia. Es así como encontramos valores aumentados de la expresión de RNAm de ferritina en las ratas tratadas con Fe como precondicionante hepático. La ferritina es la proteína encargada de almacenar el Fe intracelularmente con el fin de disminuir la ferremia, y su aumento contribuiría a disminuir la lesión hepática que causa la IR. Además, la cadena pesada de la ferritina fue identificada como un mediador antioxidante y de protección contra la acción tóxica de NF- $\kappa$ B, como se evaluó en los cultivos celulares de NIN-3T3 (26). La inducción de la ferritina es un mecanismo de regulación post-traducciona, que involucra la interacción de los IRP e IRE aumentando los niveles de RNAm de ferritina, por lo tanto aumentando su síntesis para así secuestrar el exceso de Fe evitando la citotoxicidad. La hepcidina, proteína de fase aguda sintetizada en el hígado, en condiciones de exceso de Fe se encarga de proteolizar a la ferroportina con el fin de dejar internalizado al Fe dentro de la célula, aumentando la síntesis de ferritina y disminuyendo la ferremia. Los valores obtenidos en el laboratorio indican que los niveles de RNAm de hepcidina aumentan en condiciones de IR y que dicho aumento podría contribuir a la hepatoprotección observada en ratas sometidas a tratamiento precondicionante con Fe por mayor inactivación de ferroportina. De acuerdo con estos datos, los niveles de ferroportina inducidos por Fe en el grupo Fe-sham disminuyen a niveles controles en ratas precondicionadas con Fe y sometidas a IR.

Se concluye que el Fe utilizado como método precondicionante hepático inhibe el daño hepático durante la IR, provocando el aumento de la expresión RNAm hepcidina y

ferritina, y disminuye el de la ferroportina, todas proteínas relacionadas con el metabolismo del Fe.

## **X-. Referencias bibliográficas**

- (1) Romanque P, Uribe M, Videla L. Molecular mechanisms in liver ischemic-reperfusion injury and ischemic preconditioning. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 469-476
- (2) Fernández V, Tapia G, Videla L. Recent advances in liver preconditioning: Thyroid hormone, n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and iron. *World J Hepatol* 2012; 4: 119-128.
- (3) Galleano M., Tapia G., Puntarulo S., Varela P., Videla L., Fernández V. Liver preconditioning induced by iron in a rat model of ischemia/reperfusion. *Life Sci* 2011; 89: 221-228.
- (4) Cádiz N, Castillo V, Vargas R, Fernández V. Preacondicionamiento hepático por hierro (Fe) frente a isquemia-reperfusión: participación del estrés oxidativo. *Rev Chil Est Med* 2012; 6: 93-96.
- (5) Ganz T. Hepcidin and Iron regulation, 10 years later. *Blood* 2011; 117: 4425-4433.
- (6) Goss JA, Seu P, Gao FQ, Wyllie S. Ischemia–reperfusion of rat liver modulates hepcidin in vivo expression. *Liver Transpl* 2005; 11:800–806.
- (7) Ramírez P, Marín JM, Piñero A, Chávez-Cartayar R, Parrilla P. Investigación experimental aplicada a la clínica: isquemia-reperfusión hepática. *Cir Esp* 2000; 67: 281-291.
- (8) Mendes Braz M., Elias Miró M., Jiménez Castro M.B., Casillas Ramírez A., Ramalho F.S., Peralta C. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based

on its study in experimental models. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 298657; doi: 10.1155/2012/298657.

(9) Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemic-reperfusion injury and preconditioning. *Am J physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G15-G26.

(10) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.

(11) Grande L, Roselló-Catafau J, Peralta C. El preacondicionamiento isquémico del hígado: de las bases moleculares a la aplicación clínica. *Cir Esp* 2006; 80: 275-282.

(12) Videla LA, Fernández V, Tapia G. New insights into pharmacological liver preconditioning strategies: L-3,3',5-triiodothyronine and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Rev Farmacol Chile* 2013; 6: 7-117.

(13) Fernández V, Tapia G, Varela P, Cornejo P, Videla L. Upregulation of liver inducible nitric oxide synthase following thyroid hormone preconditioning: suppression by N-acetylcysteine.

(14) Pérez G, Vittori D, Pregi N, Garbossa G, Nesse A. Homeostasis del hierro: Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2005; 39: 301-314.

(15) Forrallat M, Gautier H, Fernández N. Metabolismo del hierro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2000; 16: 149-160.

- (16) Metzler B., Jehle J., Theurl I., Ludwiczek S., Obrist P., Pachinger O. Short termprotective effects of iron in a murine model if ischemia/reperfusion. *Biometals* 2007; 20: 205–215.
- (17) Videla LA, Fernández V, Tapia G, Varela P. Oxidative stress-mediated Hepatotoxicity of iron and copper: rol of Kupffer cells. *Biometals* 2003; 16 :103-111.
- (18) Morales P, Vargas R, Videla LA, Fernández V. Nrf2 activation in the liver of rats subjected to a preconditioning sub-chronic iron protocol. *Fodd & Function* 2014; 5: 243-250.
- (19) Nemeth E, Ganz T. Hpcidin and iron-loading anemias. *Haematologica* 2006; 91: 727-732.
- (20) Forrellat M, Fernández Y, Hernández P. Nuevos conocimientos sobre el metabolismo del hierro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2005; 21: 96-104.
- (21) Harada N, Kanayama M, Maruyama A. Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts. *Arch Biochem Biophys* 2011; 508: 101–109.
- (22) Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by Hpcidin. *Annu Rev Nutr* 2006; 26: 323–342
- (23) Beaumont C. Molecular mechanisms of iron homeostasis. *Med Sci* 2004;20:68-72.
- (24) Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in the intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2000;275:19906-19912.

(25) Morales P, Vargas R, Videla L.A. and Fernández V. Kinetic changes in the activity of Nrf2 in rat liver cells induced by sub-chronic iron administration. VIII International Congress SFRBM, South American Group, Buenos Aires, Argentina 2013, pp 38, P3-07.

(26) Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F. Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species, Cell 2004; 119:529-542.