

UCH-FC  
Biotecnología  
M 528  
C-1

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**CARACTERIZACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE HIERRO EN CÉLULAS  
CACO-2 EXPUESTAS A HIERRO HEMÍNICO Y QUE SOBREENPRESAN LA  
ENZIMA HEMOXIGENASA 1.**

**Memoria de Título**

**Entregada a la**

**Universidad de Chile**

**En cumplimiento parcial de los requisitos**

**Para optar al Título de**

**Ingeniero en Biotecnología Molecular**



**por**

**María José Mendiburo Seguel**

**Agosto, 2006**

**Santiago – Chile**

**Director de Memoria de Título: Dr. Miguel Arredondo Olguín.**



**“Caracterización de la Homeostasis de Hierro en Células CACO-2 expuestas a Hierro Hemínico y que sobreexpresan la Enzima Hemoxigenasa 1”**

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

**MARÍA JOSÉ MENDIBURO SEGUEL**

Dr. Miguel Arredondo Olguín  
**Director Seminario de Título**

Firma manuscrita en azul del Dr. Miguel Arredondo Olguín, sobre una línea horizontal.

**Comisión Revisora**

Dr. Marco Tulio Nuñez González  
**Presidente**

Firma manuscrita en azul del Dr. Marco Tulio Nuñez González, sobre una línea horizontal.

Dra. Ana Preller Simmons  
**Correctora**

Firma manuscrita en azul de Dra. Ana Preller Simmons, sobre una línea horizontal.



Santiago, Agosto 31 de 2006

A Emilia

A mis padres y hermanos

A Pedro



Los quiero mucho

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Arredondo, por aceptarme y permitirme comenzar mi desarrollo científico que en su laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de Microminerales del INTA; Angélica, Paula, Carola, Deni, Negro y Sole, por la amistad y el apoyo en los momentos difíciles y la compañía en esos largos días de trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Envejecimiento, por la ayuda técnica desinteresada (especialmente a Cato).

A mi Familia, por apoyarme siempre y por creer en mí.

A Pedro, por toda la ayuda y amor, y por estar siempre ahí.

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



## INDICE DE MATERIAS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Hipótesis de Trabajo	21
Objetivo General	21
Objetivos Específicos	21
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Materiales</b>	<b>22</b>
2.1.1 Reactivos	22
2.1.2 Equipos	23
2.1.3 Materiales de Cultivo	24
2.1.4 Material Biológico	25
<b>2.2 Métodos</b>	<b>26</b>
2.2.1 Cultivo Celular	26
2.2.2 Obtención de RNA de células Caco-2	26
2.2.3 Obtención de cDNA a partir de RNA total	27
2.2.4 Amplificación del gen <i>h<sub>o</sub>l</i>	27
2.2.5 Clonación del gen <i>h<sub>o</sub>l</i> en el vector pcDNA3.1 myc- his	28
2.2.6 Transfección de células Caco-2	28
2.2.7 Obtención de <sup>55</sup> Fe-hem	29
2.2.8 Digestión de hemoglobina	29
2.2.9 Ensayos de captación y transporte de <sup>55</sup> Fe(II) y <sup>55</sup> Fe-hem	29
2.2.10 Ensayo de biotilación	30



2.2.11 Co-inmuno precipitación de HO1 y Ireg 1	31
2.2.12 Inmunodetección de HO1	32
2.2.13 Inmunodetección de DMT-1	32
2.2.14 Inmunodetección de Ireg-1	33
2.2.15 Inmunolocalización de HO1 por microscopía confocal	33
2.2.16 Co-inmunolocalizaciones de HO1/Ireg1 y HO1/GLUT 1	34
2.2.17 RT-PCR semicuantitativo de FLVCR y Hefestina	34
2.2.18 Determinación de niveles intracelulares de ferritina	35
2.2.19 Determinación del contenido total de hierro intracelular	35
2.2.20 Determinación del contenido de hierro reactivo (LIP)	35
2.2.21 Ensayo de transporte basolateral de Fe por apagamiento de calcéina	36
2.2.22 Determinación de la actividad de la enzima hemoxigenasa	37
2.2.23 Análisis estadístico	37
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
3.1 Análisis de la expresión de DMT1, Ireg-1 y HO1 en respuesta a un estímulo de Fe-hem	38
3.2 Niveles de Fe interno y Ferritina (Fn) en células expuestas a Fe-hem	40
3.3 Sobre-expresión de HO1	41
3.4 Medición del Fe reactivo (LIP) y Fn de células que sobre-expresan HO1	43



3.5 Estudios de captación y transporte de $^{55}\text{Fe}$ -hem y $^{55}\text{Fe}$ -ascorbato en células que sobre-expresan HO1	45
3.6 Estudios de localización subcelular de HO1	53
3.7 Distribución de HO1 en membranas apical y basolateral	56
3.8 Estudios de co-localización de las proteínas HO1 e Ireg-1	59
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>64</b>
<b>5. COMENTARIOS Y CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>78</b>



## LISTA DE FIGURAS



Figura 1	Estructura de la molécula de hem	3
Figura 2	Reacción de degradación del hem catalizada por la HO	7
Figura 3	Sistema de regulación post-transcripcional IRE/IRP	15
Figura 4	Esquema del vector pcDNA3.1/myc-His – HO1	28
Figura 5	Inmunodetección de las proteínas DMT1, HO1 e Ireg-1 células Caco-2 expuestas a Fe-hem	39
Figura 6	Estudio de la expresión de Ireg-1 a nivel de transcripción  A) RT-PCR semicuantitativo de Ireg-1  B) Análisis densitométrico	40
Figura 7	Contenido intracelular de Fe y Ferritina en células Caco-2 expuestas a diferentes concentraciones de Fe-hem en el medio de cultivo  A) Fe intracelular en células Caco-2 expuestas a Fe-hem  B) Fn intracelular en células Caco-2 expuestas a Fe-hem	41
Figura 8	Células transfectadas con el gen ho1 sobreexpresan la proteína HO1 y presentan una mayor actividad HO que células control  A) Inmunodetección de HO1 en células transfectadas con el vector pcDNA3.1myc-His vacío (control) y transfectadas con el vector pcDNA3.1 myc-His- HO1	43



	B) Análisis densitométrico	
	C) Ensayo de actividad de HO1	
Figura 9	Determinación del contenido de Fe reactivo (LIP) de células HO1 y control	44
Figura 10	Fn intracelular en células HO1 y control	45
Figura 11	Ensayo de captación apical de <sup>55</sup> Fe-hem y transporte basolateral de <sup>55</sup> Fe en células control y HO1	47
	A) Curso temporal de la captación apical de <sup>55</sup> Fe-hem en células HO1 y control	
	B) Curso temporal del transporte apical-basolateral de <sup>55</sup> Fe en células HO1 y control	
Figura 12	Células control presentan una mayor transporte de Fe-hem hacia basolateral que células HO1	48
Figura 13	Estudio de la expresión de FLVCR a nivel transcripcional.	49
	A) RT-PCR semicuantitativo de FLVCR	
	B) Análisis densitométrico	
Figura 14	Medición de apagamiento de calceína en el compartimento basolateral de células HO1 y control	50
Figura 15	Estudio de la expresión de Hefestina a nivel transcripcional.	52
	A) RT-PCR semicuantitativo de Hefestina	
	B) Análisis densitométrico	
Figura 16	Ensayo de captación apical y transporte basolateral	52



	de $^{55}\text{Fe}$ en células control y HO1	
	A) Curso temporal de la captación apical de $^{55}\text{Fe}$ en células HO1 y control	
	B) Curso temporal del transporte apical-basolateral de $^{55}\text{Fe}$ en células HO1 y control	
Figura 17	Immunolocalización de HO1 en células Caco-2 expuestas y no-expuestas a Fe-hem en el medio de cultivo	54
	A) Immunolocalización de HO1 en células expuestas a Fe-hem en el medio de cultivo	
	B) Contraste de Fase de A)	
	B) Immunolocalización de HO1 en células que no fueron expuestas a Fe-hem en el medio de cultivo	
	D) Contraste de fase de B)	
Figura 18	Immunolocalización de HO1 en células Caco-2 crecidas en insertos bicamerales de soporte claro y expuestas a Fe-hem 50 $\mu\text{M}$	56
	A) Galería de cortes de células Caco-2 crecidas en insertos bicamerales	
	B) En recuadros, vistas ortogonales de la imagen central	
	C) Esquema de los cortes de la galería mostrada en A)	
	D) Esquema del corte ortogonal en B	
Figura 19	Distribución de HO1 en células Caco-2 expuesta a Fe-hem en el medio de cultivo.	58

	A) Biotinilación de membrana apical y basolateral	
	B) Co-inmunolocalización de HO1 y GLUT1	
Figura 20	Co-inmunoprecipitación de HO1 e Ireg1	61
	A) Control negativo	
	B) Co-inmunoprecipitación Ireg1/HO1	
	C) Co-inmunoprecipitación HO1/Ireg1	
Figura 21	Co-inmunolocalización de las proteínas HO1 e Ireg1	63
	A) Ireg1	
	B) HO1	
	C) Combinación de A y B	
	D,E,F) Vista lateral de A, B y C respectivamente	
Figura 22	Modelo integrativo de las vías de captación, transporte y translocación de Fe inorgánico y Fe-hem en células intestinales propuesto a partir de los resultados obtenidos durante este trabajo	77

## RESUMEN

Las células del epitelio intestinal son el principal sitio de absorción de hierro (Fe) dietario, el cual puede ser captado como Fe-hem (Fe contenido en el grupo hem de hemoproteínas) o Fe inorgánico. El Fe-hem constituye la fuente de Fe más biodisponible, ya que no necesita de factores luminales para su absorción. La captación de ambas fuentes de Fe ocurre por vías independientes; mientras que el Fe inorgánico ingresa a la célula a través de DMT1, el Fe-hem es captado a través de HCP1, que presumiblemente realiza un transporte transmembrana de la molécula. Una vez en el interior de la célula el Fe-hem es degradado por HO1, liberando Fe, CO y biliverdina, la cual es rápidamente reducida a bilirrubina. HO1 es inducible por numerosos estímulos que comparten la característica de poseer propiedades pro-oxidantes, entre ellos su sustrato el Fe-hem, y se ha visto que esta inducción confiere protección a las células frente al estrés oxidativo. Se ha atribuido esta protección a los productos de la degradación del Fe-hem, ya que CO posee propiedades anti-inflamatorias y anti-apoptóticas, la bilirrubina actúa como antioxidante y el Fe liberado es capaz de inducir la expresión de Ferritina, de manera que se previene el potencial daño oxidativo que puede producir el Fe libre. Sin embargo, estudios en ratones knockout para la proteína han sugerido un mecanismo adicional de protección mediado por HO1, en el cual ésta promueve la salida de Fe, evitando así un aumento en los niveles intracelulares de Fe. Con la hipótesis de que la sobreexpresión de HO1 aumenta la salida de Fe a través de la membrana basolateral de células intestinales, en este trabajo hemos generado una línea estable de células tipo epitelio intestinal Caco-2 que sobreexpresan HO1 y hemos encontrado que estas

células presentan un marcado aumento tanto en la captación como en la salida de Fe al ser incubadas con Fe-hem, sin embargo no se observa el mismo efecto al ser incubadas con Fe inorgánico. Además observamos una mayor tasa de salida de la molécula de Fe-hem en células control en comparación a células transfectadas con el cDNA de HO1.

Por otro lado, hemos caracterizado el efecto de la exposición de células Caco-2 silvestres a Fe-hem. Encontramos que esta exposición induce un aumento en los niveles intracelulares de Fe y en la expresión de HO1 y la proteína de almacenaje Ferritina. Sin embargo, no se observó un cambio significativo en la expresión de DMT1 e Ireg1. Estos resultados difieren a lo visto en células Caco-2 expuestas a Fe inorgánico, en que una mayor concentración intracelular de Fe disminuye la actividad de IRPs, lo cual resulta en la producción de proteínas involucradas en el almacenamiento de Fe y disminución en las proteínas involucradas en la captación. Sugerimos, por lo tanto, que el Fe-hem no es capaz de modular la actividad de IRPs como el Fe inorgánico y probablemente no forme parte del pool común de Fe intracelular junto al Fe captado en forma inorgánica, sino que sigue otro destino intracelular. No observamos cambios en la expresión del exportador Ireg-1, por lo que el aumento en la salida de Fe no podría explicarse por un aumento en la expresión del exportador. Estudios de localización subcelular de HO1 frente a un estímulo de Fe-hem indican un cambio desde una localización perinuclear, asociada al retículo endoplasmático, hacia la membrana plasmática en esta condición, donde co-localiza parcialmente con Ireg-1. Ensayos de biotilación muestran la presencia de HO1 tanto en la membrana apical, donde podría cumplir una función en la captación de Fe-hem, como en la membrana basolateral.

## ABSTRACT

Intestinal epithelial cells are the main site of iron (Fe) absorption. Fe can be absorbed as Heme-Fe (Fe found in the heme group of heme proteins) or as inorganic Fe. Heme-Fe is the most bioavailable form of Fe, for it doesn't need luminal factors for its absorption. Uptake of both Fe sources occurs by independent pathways; while inorganic Fe enters the intestinal cell through the transporter DMT1, heme-Fe uptake takes place through the recently identified heme transporter HCP1, which presumably carries out a transmembrane transport of the molecule. Once inside the cell, the degradation of heme-Fe is catalyzed by HO1, which releases the Fe, CO and biliverdin. HO1 can be rapidly induced by a variety of stimulus that share pro-oxidant properties, among them its natural substrate, heme-Fe. It has been reported that HO1 induction confers cytoprotection to several cell types against oxidative stress, and this effect has been attributed to the by-products of heme catalysis. CO has been shown to have anti-inflammatory and anti-apoptotic properties, biliverdin is rapidly transformed into bilirubin, which has an anti-oxidant effect, and free Fe is thought to induce Ferritin expression. However, studies in knockout mice lacking HO1 function have revealed an additional role for the protein, promoting Fe extrusion from tissues, avoiding this way an increase in intracellular Fe content. With the hypothesis that HO1 overexpression increases Fe efflux through the basolateral membrane of intestinal cells, we generated a Caco-2 stable cell line that overexpresses HO1, and found that these cells show increased heme-Fe uptake and Fe efflux when incubated with heme-Fe. We did not see the same effect when cells

were exposed to an inorganic Fe source. Furthermore, we report a decreased heme-Fe extrusion through the basolateral membrane of cells transfected with HO1 cDNA compared to control cells.

Furthermore, we characterized the effect of heme-Fe exposure on Fe homeostasis proteins in wild type Caco-2 cells. We observed that this exposure induced increased expression of HO1 and the storage protein Ferritin. However, we did not see a significant change in the expression of DMT1 and Ireg1. These results differ from what has been described for Caco-2 cells exposed to inorganic Fe sources, where an increase in intracellular Fe concentration induces a decrease in IRP proteins activity, leading to an upregulation of proteins involved in Fe storage and a downregulation of proteins involved in its uptake. Therefore, we suggest that heme-Fe is not able to regulate IRPs activity as inorganic Fe does, and probably does not become part of a common pool of intracellular iron with Fe derived from inorganic sources. We did not observe a change in the expression of the Fe exporter Ireg-1, therefore we believe that the increase in Fe release cannot be explained by an increase in any transporter available for this process. Subcellular localization studies of HO1 protein in cells exposed to heme-Fe indicate a change from a perinuclear, endoplasmic reticulum-associated location towards the plasmatic membrane, where it partially co-localizes with Ireg-1. Biotinylation studies reveal the presence of the protein in the apical membrane, where it could play a role in heme-Fe uptake, and also in the basolateral membrane.

## ABREVIATURAS

BSA	: Albúmina sérica de bovino
cDNA	: Acido desoxirribonucleico complementario
D.E	: Desviación estándar
DMT1	: Transportador de metales divalentes 1
DTT	: Ditioneitol
EDTA	: Acido etilendiaminotetracético
Fe	: Hierro
Fe-hem	: Hierro hemínico
FLVCR	: Receptor de virus de leucemia felina subgrupo C
Fn	: Ferritina
HO1	: Hemoxigenasa 1
IRE	: Elemento que responde a hierro
IRP	: Proteína reguladora de hierro
Ireg1	: Proteína regulada por Fe 1
KDa	: KiloDalton
LIP	: Contenido de hierro reactivo
MOPS	: Acido 3-[N-morfolino] propano sulfónico
ON	: Over Night, toda la noche.
PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
RNA <sub>m</sub>	: Acido ribonucleico mensajero



RTf : Receptor de transferrina  
RT-PCR : Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa  
SDS : Dodecil sulfato de sodio  
SFB : Suero fetal bovino  
SIH : Salicilaldehído isonicotinol  
TER : Resistencia eléctrica transepitelial  
Tf : Transferrina  
Tween 20 : Polioxietilensorbitan monolaurato

## 1. INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es un nutriente que juega un rol esencial en distintas funciones biológicas. Tiene la propiedad de existir en dos estados de oxidación y ser convertido en formas funcionales como hem y el núcleo de Fe-azufre, gracias a lo cual es capaz de mediar reacciones bioquímicas fundamentales como procesos de transporte y almacenamiento de oxígeno, fosforilación oxidativa, metabolismo de neurotransmisores y síntesis de DNA. Constituye un componente esencial en la cadena respiratoria, confiriendo actividad redox a citocromos y otras enzimas, como xantina oxidasa, catalasa, NADH deshidrogenasa, ribonucleótido reductasa y aconitasa. Un exceso de Fe es potencialmente tóxico, ya que puede participar en la generación de radicales libre a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Wardman y Candelais, 1996). Los radicales libre son especies altamente reactivas que atacan membranas celulares, proteínas y DNA. Con estos antecedentes se puede deducir que tanto la carencia como el exceso de este metal provocan cambios patológicos en el organismo, por lo que la homeostasis de Fe es altamente regulada por una compleja red de transportadores, moléculas de almacenamiento y reguladores.

La homeostasis de Fe es mantenida mediante la regulación de su absorción y el mantenimiento de reservas corporales. A diferencia de otros minerales, el ser humano no posee un mecanismo regulado que permita la excreción del exceso de este metal. Las pérdidas de Fe ocurren por mecanismos inespecíficos como exfoliación de células, hemorragias, y fluidos como lágrimas y sudor. En individuos sanos se absorbe 1 mg de

Fe al día, cantidad suficiente para reemplazar las pérdidas fisiológicas. De un total de 3 a 4 gramos de Fe total en el organismo aproximadamente 2,5 gramos forman parte de la hemoglobina presente en eritrocitos y glóbulos rojos maduros, los cuales presentan la mayor demanda funcional por este metal. Los glóbulos rojos senescentes son fagocitados por el sistema reticuloendotelial, el cual puede almacenar Fe, liberarlo al plasma o relocalizarlo al hígado, dependiendo de los requerimientos corporales.

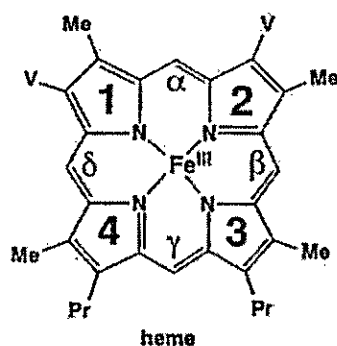
El intestino es el principal sitio de regulación de la homeostasis de Fe. Es allí donde ocurre la absorción de Fe dietario, el cual puede encontrarse como Fe inorgánico (Fe no-hem) o como Fe hemínico (Fe-hem), el cual forma parte del grupo hem de hemoproteínas y se adquiere en la dieta principalmente contenido en la hemoglobina y mioglobina de la carne. La absorción del Fe no-hem y la de Fe-hem ocurren en la parte proximal del intestino, específicamente en el duodeno, donde el bajo pH incrementa la solubilidad del Fe no-hem y provee un ambiente propicio para que el hem sea quelado por productos proteolíticos de la digestión que previenen su agregación.

Los primeros pasos en la captación de Fe no-hem y Fe-hem son diferentes (Layrisse y cols, 1969; Halberg y Bjorn-Rasmush, 1972). El Fe-hem, a diferencia del Fe no-hem, es altamente biodisponible, constituyendo la principal fuente de Fe dietario en países donde los productos de origen animal son parte significativa de la dieta. Su absorción ocurre principalmente en el duodeno y hay un gradiente de absorción de Fe-hem a lo largo del intestino, similar al visto para el Fe no-hem (duodeno > jejunum > ileum) (Wheby y cols, 1970). Actualmente, existe una controversia en cuanto a si la

absorción de Fe-hem se ve afectada por el estatus de Fe corporal en la misma medida que la absorción de Fe no-hem. Se ha visto que la absorción de Fe-hem no se ve afectada en ratas deficientes de Fe, mientras que la de Fe no-hem se ve incrementada (Conrad y cols, 1966). Sin embargo, Bannerman y cols (1965) demostraron que ratas deficientes de Fe incrementaban la absorción de Fe-hem 10 veces en comparación a los controles.

### i. La molécula de hem y la Hemoxigenasa.

El grupo hem o protoporfirina IX de Fe es una molécula versátil por naturaleza y cumple múltiples funciones cuando se encuentra asociado a proteínas. Es esencial para la vida, ya que participa en reacciones oxidativas, de transferencia electrónica y de entrega de oxígeno molecular a las células.



**Figura 1: Estructura de la molécula de hem.** El hem o protoporfirina IX de Fe, consiste en un tetrapirrol cuadrado plano, en que los cuatro anillos pirrólicos se encuentran unidos por puentes meteno ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ). Es capaz de quelar un átomo de Fe central.

La estructura del hem consiste en un tetrapirrol cuadrado plano (Figura 1), en que los cuatro anillos pirrólicos se encuentran unidos por puentes meteno ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ). La conjugación del macrociclo tetrapirrólico le da el color que caracteriza a las porfirinas. Las moléculas de porfirina no unen oxígeno y no participan en reacciones oxidativas catalizadas por proteínas ni en procesos de transferencia de electrones; estas propiedades les son conferidas al quelar un metal de transición divalente. La protoporfirina ferrosa (Fe(II)) es rápidamente oxidada a protoporfirina férrica (Fe(III)), la cual tiene carga positiva y es generalmente aislada como cloruro en la forma de hemina.

El hem es un importante cofactor de un diverso grupo de hemoproteínas, incluyendo aquellas involucradas en transporte y almacenamiento de oxígeno (hemoglobina y mioglobina), transferencia de electrones y metabolismo de drogas (citocromos) y transducción de señales (óxido nítrico sintasas). Además, constituye la fuente de Fe dietario más biodisponible, ya que su absorción en el intestino no se ve afectada por factores lumináres como en el caso del Fe no-hem. Por otro lado, es potencialmente tóxico dada sus propiedades pro-oxidantes, siendo capaz de catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno que pueden causar daño oxidativo a macromoléculas como proteínas y lípidos.

El hem participa en la regulación de variados procesos metabólicos, como transcripción, traducción y diferenciación celular. Cumple un importante rol en la regulación de la expresión de ciertos genes, actuando como ligando para factores de transcripción tanto en procariontes y levaduras como en mamíferos. En estos últimos, el

hem ejerce un efecto dramático en la proliferación y diferenciación de progenitores hematopoyéticos. No sólo es incorporado como un componente estructural de la hemoglobina, sino que también provoca un incremento en la expresión del gen de la globina y enzimas de la vía biosintética del hem en células eritroides (Charnay y Maniatis, 1983). El tratamiento con hemina aumenta tanto el número de receptores para transferrina (Tf) como el contenido de ferritina (Battistini y cols, 1991; Coccia y cols, 1992).

Esta capacidad de regulación génica se debe principalmente a que el grupo hem puede unirse al factor de transcripción Bach1, reprimiendo la actividad de unión a DNA de éste (Ogawa y cols, 2001; Tahara y cols, 2004). Este factor de transcripción de 739 aminoácidos posee un dominio bZip (cierre de leucina básico) y un dominio BTB/POZ, involucrado en la regulación de la estructura de la cromatina. Puede formar un heterodímero con una proteína de la familia Maf, reprimiendo la transcripción de genes blancos, uniéndose a elementos de reconocimiento de Maf (MAREs) (Igarashi y cols, 1998). Aumentos en los niveles de hem intracelular inactivan al represor Bach1, resultando en la activación de los genes regulados por MAREs (Ogawa y cols, 2001). De esta manera, Bach1 puede funcionar como un controlador de la regulación detectando los niveles de hem y reprimiendo o activando la transcripción.

Los primeros estudios de la vía de absorción del Fe-hem en el duodeno han sugerido que el transporte de hem involucra un proceso de endocitosis, observándose en estructuras túbulo-vesiculares en el citoplasma apical de células intestinales de perro

(Parmley y cols, 1981). Worthington y cols (2001), basándose en sus resultados de dependencia de temperatura, competencia con análogos del grupo hem, saturabilidad del proceso de captación e inducibilidad de esta actividad transportadora en condiciones de privación de Fe, mostraron evidencias de un transporte de hem mediado por proteína. Recientemente, se identificó una proteína transportadora de hem en el intestino (Shayeghi y cols, 2005). Este transportador ha sido llamado HCP1 (Heme Carrier Protein 1) y su secuencia proteica comparte homología con transportadores de tetraciclina bacterianos. El RNAm de HCP1 no posee IREs (Iron Responsive Elements), se expresa abundantemente en la mucosa del duodeno y parece no ser regulado por el status de Fe, pero sí es fuertemente inducido por hipoxia. La localización subcelular en el enterocito se ve influenciada por el status de Fe, observándose en la membrana apical en condiciones de deficiencia de Fe, mientras que en sobrecarga de Fe se observa en el citoplasma. Los autores proponen que HCP1 realiza un transporte de transmembrana del hem, y no excluyen la posibilidad de que otras proteínas o factores luminales jueguen un rol en su captación.

Una vez en el interior de la célula intestinal el hem es degradado oxidativamente por la enzima Hem Oxigenasa (HO), liberándose Fe(II), CO y biliverdina X $\alpha$ , como se muestra en la Figura 2.

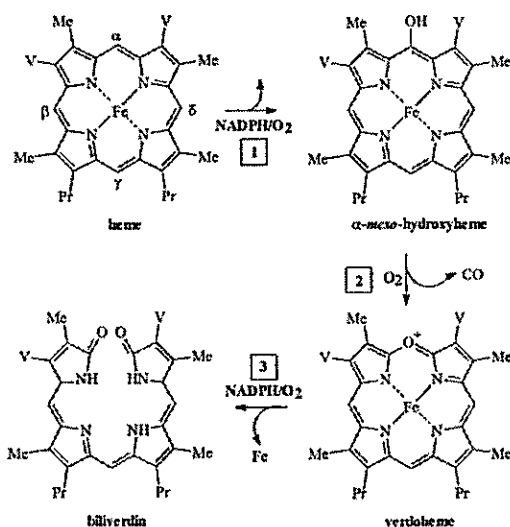


Figura 2: Reacción de degradación del hem catalizada por la HO.

La molécula de hem contiene 4 potenciales sitios de clivaje por la HO, sin embargo sólo un puente  $\alpha$ -meteno es clivado, posiblemente por regulación estérica. La reacción catalizada por la HO requiere de la presencia de oxígeno y un agente reductor (NADPH) que activa al oxígeno y reduce el Fe del hem desde su estado Fe(III) a Fe(II) y/o mantenga al Fe como Fe(II). La enzima citocromo P450 NADPH reductasa transfiere un electrón desde el NADPH al hem, y utiliza oxígeno molecular para realizar la reacción. Por cada molécula de hem oxidada, se necesitan 3 moléculas de oxígeno y 2 de NADPH.



## **Regulación y distribución de la HO**

La HO fue descubierta a finales de la década de los 60s (Tenhunen y cols, 1968). Su actividad enzimática ha sido detectada en la fracción microsomal del bazo, hígado y riñón de rata. A la fecha, se han identificado 3 isoformas de HO que catalizan esta reacción: HO1, HO2 y HO3.

La actividad enzimática de la HO1 (32 kDa) o HSP32 (Heat Shock Protein 32), ha detectado en tejidos como hígado, bazo, páncreas, intestino, pulmón, corazón y próstata, entre otros. Su expresión es inducible por numerosos estímulos como NO (Datta y Lianos, 1999), citoquinas (Rizzardini y cols, 1998), metales pesados (Eyssen-Hernandez y cols, 1996), endotoxina (Carraway y cols, 1998), hipoxia (Carraway y cols, 2000), hiperoxia (Lee y cols, 1996), radiación UV (Ossola y Tomaro, 1998), hem (Tenhunen y cols, 1968), estrés por calor (Shibahara y cols, 1987) y peróxido de hidrógeno (Keyse y Tyrrel, 1989). Se han identificado elementos regulatorios en la región promotora de HO1, incluyendo sitios de unión a factores de transcripción que responden a estrés oxidativo, como el factor nuclear NFκB y la proteína activadora AP-2 (Lavrovsky y cols, 1994). Además, contiene una copia funcional MARE inmediatamente río abajo de un elemento de respuesta a cadmio (Kitamuro, 2003), lo que permite que la enzima sea inducida por el hem.

HO2 (36 kDa) es sintetizada constitutivamente, y expresada en altos niveles principalmente en cerebro y testículos. Esto ha llevado a proponer que el rol principal de

la HO2 es la producción de CO como segundo mensajero y neurotransmisor. La isoenzima HO3 fue encontrada en el cerebro de rata, pero no se detectó su actividad enzimática a pesar de que comparte un 90% de identidad con HO2 (McCoubey y cols, 1997).

Todas las HO conocidas son homólogas y a partir del alineamiento de sus secuencias, se espera que compartan los mismos mecanismos de plegamiento. Las proteínas HO1 y HO2 son productos de genes diferentes y comparten un 43 % de identidad. Los genes *ho1* y *ho2* se localizan en el cromosoma 22q12 y 16p13.3, respectivamente (Kutty y cols, 1994). Por otro lado, HO1 y HO2 poseen un segmento de 24 aminoácidos perfectamente conservados, que forman un bolsillo hidrofóbico que une los pirroles 1 y 2 del hem a través de uniones electrostáticas. Este bolsillo no reconoce al metal de las metaloporfirinas, sino que su especificidad es sólo hacia las cadenas laterales del anillo porfirínico. Por esta razón, metaloporfirinas no fisiológicas como Sn-PP, Zn-PP u otras pueden competir con Fe-PP e inhibir la actividad de la HO.

Estudios de localización intracelular de HO1 muestran que ésta se encuentra anclada a la membrana de microsomas en el retículo endoplasmático (RE) por una secuencia hidrofóbica de 22 aminoácidos cerca de su carboxilo terminal. Para que la catálisis del hem ocurra es esencial que éste alcance el centro activo de la enzima, para lo cual debe ser transportado hasta el RE. Los mecanismos de transporte intracelular de hem aún no han sido explorados, y su conocimiento facilitaría el desarrollo de aplicaciones clínicas contra enfermedades que involucren fallas en su metabolismo.

Los procesos celulares que subyacen la inducción de HO1 son complejos y muy regulados. Todos los inductores tienen en común que afectan el estado redox celular. La inducción de HO1 en respuesta a hem, metales pesados (cobalto; cadmio), NO, LDL oxidado y citoquinas es consecuencia de transcripción *de novo* (Rizzardini y cols, 1993).

### **Rol citoprotector de HO1**

Como se mencionó anteriormente, la expresión de HO1 puede ser inducida por una variedad de estímulos no-hem capaces de generar especies reactivas de oxígeno. Estudios realizados por Keyse y Terrel (1987), Vile y Terrel (1993) y Maeshima y cols (1996) han demostrado no sólo que la HO1 puede ser inducida por numerosos agentes que causan estrés oxidativo, sino además que la enzima posee una función citoprotectora frente a este estrés en muchos tipos celulares. Este paradigma es apoyado por las observaciones hechas en ratones y humanos deficientes de la proteína. Poss y Tonegawa (1997a) generaron ratones HO1(-/-) por delección dirigida del gen HO1. Analizaron el efecto de agentes oxidantes en células aisladas de estos ratones deficientes en HO1, observando que estas células son más susceptibles a acumular radicales libres y a daño oxidativo *in vitro* e *in vivo*, estableciendo que HO1 constituye un importante sistema antioxidante. Yachie y cols (1999) identificaron el primer caso de un paciente deficiente en HO1. Este paciente presentó alteraciones fenotípicas similares a las de los ratones HO1(-/-), incluyendo retardo del crecimiento, anemia, leucocitosis y susceptibilidad a estrés oxidativo. Keyse y Tyrrel (1989) demostraron que la HO1 confiere citoprotección

contra stress oxidativo particularmente si HO1 es inducida antes de la exposición al agente estresante.

Se han postulado varios mecanismos mediante los cuales la HO1 ejerce su efecto protector. Un aumento en la actividad HO1 lleva a una disminución de la concentración de hem intracelular, el cual es muy tóxico dadas sus propiedades pro-oxidantes. Por otro lado, se cree que los productos generados por HO1 en la reacción de catálisis del hem también pueden jugar un importante rol en la mantención de esta protección.

- **CO.** Por décadas se consideró al CO como un gas tóxico y letal a altas concentraciones por su habilidad para competir con el oxígeno por la unión a hemoglobina. Últimamente, sin embargo, se ha comprobado que a bajas concentraciones puede tener efectos protectores. Este gas suprime la respuesta pro-inflamatoria y promueve la respuesta anti-inflamatoria de macrófagos, inhibiendo la producción de TNF- $\alpha$  e induciendo la producción de IL-10 (Otterbein y cols, 2000). Este efecto anti-inflamatorio se ve reflejado en la prevención de la activación y agregación de plaquetas. Además previene la apoptosis en varios otros tipos celulares, como células endoteliales, fibroblastos y hepatocitos. También participa en la regulación del tono vasomotor promoviendo la vasodilatación, función que explicaría el rol anti-inflamatorio del CO, permitiendo el flujo sanguíneo al sitio de inflamación.

- **Biliverdina y bilirrubina.** La biliverdina generada en la reacción de degradación de hem es rápidamente reducida a bilirrubina por la enzima biliverdina reductasa. Ambas moléculas ejercen un efecto protector debido a sus propiedades antioxidantes, secuestrando radicales peroxilo e inhibiendo la peroxidación de lípidos.
- **Fe(II) y ferritina.** La liberación de Fe(II) induce la rápida expresión de ferritina (Fn), la proteína almacenadora de Fe. Esto daría cuenta de un rol protector, ya que disminuye el efecto pro-oxidante que provocaría la presencia de Fe libre capaz de generar radicales hidroxilo. Eisenstein y cols (1991) demostraron que la expresión de Fn aumenta junto con la de HO1 y disminuye con la inhibición de la actividad HO1 en fibroblastos de rata. La expresión de Fn mediaría la protección observada en la inducción con hem de HO1. En contraste, en un modelo de shock endotóxico en ratas la potente citoprotección provista por HO1 pareció ser independiente de ferritina, ya que la administración de apoferritina y Fe (para inducir la expresión de ferritina) no fueron efectivas en conferir protección (Otterbein y cols, 1997).

### **Rol de HO1 en la salida de Fe intracelular.**

Se ha sugerido otro mecanismo de citoprotección mediado por HO1 que consiste en la movilización del Fe intracelular y la facilitación de su salida desde las células. La

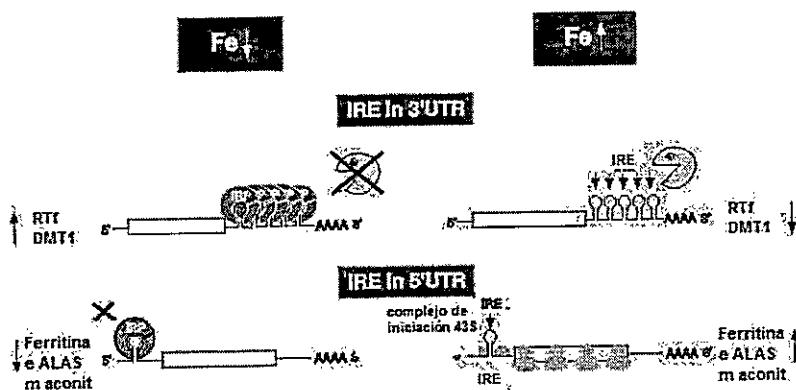
primera evidencia de una relación entre HO y la salida de Fe vino de los estudios hechos por Poss y Tonegawa en 1997(b), en los cuales se caracterizaban ratones HO1<sup>-/-</sup>. Estos ratones adultos exhibieron un crecimiento retardado y anemia normocrómica microcítica. Sus riñones e hígados mostraron evidencia de deposición de Fe, sin embargo sus niveles de Fe en el plasma se encontraban por debajo de los normales, indicando que HO1 es crucial para la expulsión de Fe desde los sitios de almacenamiento en tejidos. Ferris y cols (1999) demostraron que la actividad HO1 está relacionada con mecanismos de salida de Fe. Sobreexpresaron HO1 en células HEK 293 y monitorearon la entrada y salida de <sup>55</sup>Fe de las células, observándose un marcado incremento en la salida de Fe. Por el contrario, cultivos primarios de fibroblastos de ratones HO1<sup>-/-</sup> mostraron una gran disminución en esta salida.

El enterocito es uno de los pocos tipos celulares, junto con las células del sistema reticuloendotelial (las cuales reciclan el hem de eritrocitos senescentes), que se encuentran expuestos a hem y lo captan desde el medio extracelular. Esta capacidad de la célula intestinal para captar hem se traduce en un importante aporte de Fe dietario, crucial en la mantención de la homeostasis corporal de este mineral. Una vez internalizada la molécula de hem, se cree que el Fe generado en la reacción catalizada por HO1 pasa a formar parte del pool común de Fe intracelular, y por lo tanto comparte los mismos mecanismos de transporte y almacenamiento que el Fe adquirido como Fe no-hem.

Es necesario conocer y comprender los mecanismos de transporte y almacenamiento de Fe para poder integrar las vías de captación, degradación y síntesis de hem y las de captación, translocación y almacenamiento de Fe en el enterocito. Para esto, se explicará brevemente los aspectos clave de la mantención de la homeostasis de Fe en dichas células.

## ii. **Metabolismo intracelular de Fe en la célula intestinal.**

La expresión de las proteínas involucradas en la captación, almacenaje y uso del Fe es controlada por el sistema IRE/IRP (Iron Responsive Element/Iron Regulatory Protein). Las proteínas IRP pueden unirse a secuencias IRE presentes en el RNAm de proteínas involucradas en la homeostasis y utilización de Fe, modulando la expresión post-transcripcional de estas proteínas (Figura 3). La actividad de las proteínas IRP es regulada por los niveles de Fe intracelular. Altos niveles de Fe provocan una disminución en la actividad de unión a RNA de la proteína IRP1 y la degradación de IRP2, lo cual resulta en la traducción de Fn (almacenamiento de Fe) y disminución de las proteínas involucradas en su captación.



**Figura 3: Sistema de regulación post-transcripcional IRE/IRP.** A bajo Fe intracelular IRP1 e IRP2 tienen actividad de unión IREs, secuencias presentes en el 3' o 5'UTR (UnTranslated Region) de los RNAm involucrados en el metabolismo de Fe. Esta unión, estabiliza el RNAm cuando la secuencia IRE se encuentra en el 3'UTR del mensajero (DMT1 y RTf) e inhibe la formación del complejo de iniciación de la traducción cuando la secuencia IRE se encuentra en el 5'UTR (Fn, eALAS y aconitasa mitocondrial). Esto induce la síntesis de proteínas de captación y disminución de las proteínas de almacenaje de Fe y de síntesis de Fe-hem. Al aumentar el Fe intracelular IRP1 adquiere un cluster 4Fe-4S y pierde su capacidad de unirse a RNA, transformándose en una aconitasa citoplasmática. Los transcritos con IRE en el 3'UTR son degradados y los con IRE en el 5'UTR son traducidos. La proteína IRP2 es ubiquitinada y degradada en proteosomas. Esto provoca una disminución en las proteínas de captación de Fe y un aumento en los de Ferritina y eALAS. (Figura extraída de <http://www.uclm.es/inabis2000/symposia/files/138/figure1.htm>)

### Fase de Captación.

La absorción intestinal de Fe es regulada según las necesidades del organismo, las cuales se ven reflejadas en los niveles de transferrina (Tf) presentes en el plasma. La Tf es capaz de unir 2 átomos de Fe, los cuales obtiene desde la dieta y del hem que es degradado por la fagocitosis de glóbulos rojos senescentes. La Tf circulante es reconocida por su receptor, RTf, presente en la membrana basolateral de los enterocitos, y es endocitada como complejo RTf-Tf-Fe. En la célula, la vesícula endocítica es acidificada, el Fe(III) es liberado, y el RTf asociado a la apo-Tf es reciclado a la superficie celular. Allí, el pH neutro disminuye la afinidad de la Tf por su receptor y la apoTf es liberada a la circulación. El Fe(III) es reducido por una reductasa dependiente



de ácido ascórbico y el Fe(II) es transportado hacia el citosol, donde queda biodisponible para la síntesis de proteínas. El exceso de Fe es almacenado en Fn.

La captación de Fe desde el lumen intestinal hacia el enterocito es realizada por el transportador de metales divalentes DMT1/DCT1/NRAMP2 (Chung y Wessling-Resnick, 2003). DMT1 es una proteína de 561 aminoácidos, con 12 segmentos transmembrana y con los extremos amino y carboxilo terminal ubicados hacia el citoplasma. Se localiza en la membrana apical y en endosomas tardíos y lisosomas de enterocitos, donde DMT1 transferiría el Fe(II) libre desde el endosoma al citoplasma durante el ciclo intracelular de la Tf. El RNAm de DMT1 se expresa principalmente en duodeno y aumenta en la deficiencia de Fe. Por empalme alternativo, se generan 4 RNAm para DMT1, uno con motivo IRE en la región 3' no traducida y otro sin este motivo, lo que resulta en la activación de la expresión de la proteína por el sistema IRE/IRP en deficiencia de Fe, y por lo tanto en un aumento en la captación del metal. La forma sin motivo IRE daría cuenta de una actividad basal de transporte, independiente de la concentración de Fe intracelular. El transporte de Fe mediado por DMT1 está acoplado a protones y requiere un gradiente de pH.

DMT1 transporta Fe en forma de ión ferroso (Fe(II)), por lo que es necesaria la existencia de una reductasa apical que reduzca al Fe(III) presente en la dieta a la forma biodisponible. La presencia de dicha reductasa, llamada Dcytb fue descrita poco tiempo después que DMT1. Su expresión puede ser inducida por hipoxia y deficiencia de Fe, ambos factores estimulan la absorción de Fe dietario, y se localiza principalmente en el

duodeno. Su actividad está asociada a una proteína-hem tipo b. No comparte homología con reductasas férrica descritas en plantas o levaduras, lo que indica que las reductasas férricas de mamíferos, plantas y levaduras evolucionaron independientemente.

### **Fase de transferencia.**

Una de las proteínas involucradas en la transferencia de Fe a través de la membrana basolateral de enterocitos es la ferroportina/Ireg1/MTP1 (Abboud y Haile, 2000). El RNAm de Ireg1 y los niveles de proteína son regulados por Fe. La deficiencia de Fe, anemia e hipoxia inducen la expresión de Ireg1. Hay evidencia de que esta expresión es inducida en células del bazo y macrófagos por sobrecarga de Fe en lugar que por deficiencia de Fe, lo que indica que hay diferencias tejido-dependientes en la expresión de Ireg1 (Yang y cols, 2002). La región 5' no codificante del RNAm de Ireg1 contiene una secuencia IRE muy conservada. Ensayos de cambio de banda muestran que el IRE de Ireg1 es activo y une IRP1 e IRP-2 (McKie cols, 2000). La proteína codificada posee 10-12 segmentos transmembrana y se localiza en la membrana basolateral, principalmente en la zona del duodeno y la placenta, donde está involucrada en la transferencia de Fe entre las circulaciones materna y fetal. Recientemente, se ha propuesto que Ireg1 localiza además en la membrana apical de células Caco-2, y actuaría como modulador en la captación de Fe(II) a través de una posible interacción con DMT1. (Thomas y Oates, 2005).

En un sistema de expresión en ovocitos de *Xenopus* se demostró que Ireg1 estimula la salida de Fe (Donovan y cols, 2000; McKie y cols, 2000). El mecanismo de

transporte de Fe mediado por Ireg1 aún no es completamente conocido. Una hipótesis razonable es que Ireg1 transporta Fe(II) y no Fe(III), ya que el primero constituye la forma más biodisponible de Fe y hay evidencia de que el Fe presente en el citosol se encuentra en esa forma (Breuer y cols, 1995). La forma Fe(III), por otro lado, es virtualmente insoluble y por lo tanto los sistemas de transporte de Fe(III) requieren la presencia de un quelante.

Varias líneas de investigación han sugerido que la oxidación del Fe, es crítica en el proceso de extrusión del Fe desde las células, antes de su incorporación a la Tf. Ya que la transferrina sólo une Fe en su forma férrica (Fe(III)), la ferroxidasa debe cumplir un rol importante acelerando el proceso por el cual la Tf es cargada de Fe(III). El rol de la ceruloplasmina (Cp), una ferroxidasa multi-cobre, en la salida de Fe desde las células ha sido reconocido por muchos años, y ya que es una proteína plasmática que puede ser distribuida ampliamente por todo el organismo, se cree que cumple un rol en la salida de Fe desde muchos tejidos. Sin embargo, no parece jugar un papel importante en la salida de Fe desde el intestino delgado. Esta situación ha sido resuelta con la reciente identificación de una proteína homóloga a Cp llamada Hefestina, que se encontraría involucrada en la salida de Fe desde células del epitelio intestinal.

Hefestina fue descubierta en investigaciones con ratones Sla (sex-linked anemia) (Vulpe y cols, 1999). Los ratones Sla presentan defectos en la transferencia de Fe desde el enterocito a la circulación y su RNAm es abundante en el intestino delgado y colon. La hefestina posee actividad ferroxidasa, pero a diferencia de Cp, se encuentra anclada

por un dominio transmembrana. El mecanismo mediante el cual Ireg1 y hefestina transfieren el Fe a la circulación aún no se conoce, pero se sabe que es necesaria la presencia de ambas proteínas para que el proceso ocurra eficientemente. Mediante inmunolocalización se demostró que ambas proteínas se encuentran en compartimentos distintos: Ireg1 en la membrana basolateral y hefestina en la porción apical del citoplasma, por sobre el núcleo.

### iii. Modelo de epitelio intestinal Caco-2.

Los estudios de absorción intestinal en órgano completo sólo permiten evaluar la incorporación de Fe al intestino, incorporación al plasma y al organismo entero. Sin embargo, este modelo no es adecuado para determinar los detalles moleculares que sustentan estos procesos. La línea celular Caco-2 es una de las líneas celulares más utilizadas en la investigación de la homeostasis de Fe intestinal. Esta línea celular de carcinoma de colon humano sufre diferenciación enterocítica y presenta muchas de las propiedades funcionales y estructurales de células humanas epiteliales de intestino. Las células forman una monocapa altamente polarizada con uniones estrechas y microvellosidades apicales. Las células expresan proteínas relacionadas con el metabolismo de Fe: DMT1, Fn, RTf y HFE entre otras, y poseen un sistema IRP/IRE activo. Las células absorben y transportan Fe inorgánico y, al igual que en estudios en humanos, el ión ferroso es absorbido mejor que el férrico (Álvarez- Hernández y cols, 1991). La liberación de Fe a apotransferrina visto *in vivo* también ocurre en células

Caco-2 (Alvarez-Hernandez y cols, 1998). Aunque la mayoría de los estudios de absorción de Fe por células Caco-2 se han enfocado en Fe inorgánico, se sabe que, al igual que enterocitos humanos, las células Caco-2 expresan HO. Estudios de Follet y cols, (2002) y Uc y cols, (2004) han validado este modelo de epitelio intestinal para realizar estudios de absorción y transporte de Fe-hem, y para el análisis de la expresión de HO1 y otras proteínas del metabolismo de Fe. En la presente tesis se estudiará la participación de HO1 en la homeostasis de Fe en el intestino, ya que a pesar de existir evidencias que cumple un rol en el reciclaje de Fe, su contribución al mantenimiento de los niveles de Fe adecuados no ha sido examinada cuidadosamente.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La sobreexpresión de HO1 produce un aumento en la salida de Fe a través de la membrana basolateral de células Caco-2 en cultivo. Esta salida es modulada por el exportador Ireg1, el cual aumenta su expresión o actividad por efecto del incremento de actividad de HO1.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el metabolismo intracelular de Fe en células Caco-2 que han sido inducidas con Fe-hem extracelular y estudiar el efecto de la sobreexpresión de HO1 en el flujo de Fe.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener una línea estable de células Caco-2 que sobreexpresa la enzima HO1.
- Realizar estudios de captación apical y transporte apical-basolateral de Fe-hem y Fe inorgánico en esta línea celular.
- Estudiar la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo de Fe, entre ellas Ireg 1, DMT1 y RTf, en respuesta a la exposición a Fe-hem.
- Determinar la localización subcelular de HO1 frente a un estímulo de Fe-hem.
- Determinar una posible co-localización de HO1 e Ireg1 en condiciones de presencia de Fe-hem.

## 2. MATERIALES Y METODOS.

### 2.1 MATERIALES

#### 2.1.1 Reactivos

**Generales:** Tris base, Buffer fosfato salino (PBS), Hepes, PMSF, DTT,  $\beta$ -mercaptoetanol, MOPS, EDTA-Na, Ácido Bórico, NaCl, KCl, Tween 20, Glicina, Glucosa, Ácido Cítrico, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Triton X-100, Metanol, Etanol, NaOH, HCl, FeCl<sub>3</sub>, Hemina, Glicerol, Paraformaldehído, Bicarbonato de sodio, medio LB, NADPH, Pepsina, DMSO, BSA, Fe-NTA, FAS (Sulfato de Amonio Ferroso), DTPA (Ácido Dietilentriamina Pentaacético), SIH (Fe salicylaldehido isonicotinoyl hidrazona).

**Anticuerpos:** anti-myc (Sigma), anti-actina humano (Sigma), anti-HO1 humana (US Biological), anti-HO1 humana (Santa Cruz Biotechnology), anti- DMT1 humano, anti-Ireg1 humano, anti-HFE humano, anti-RTf humano, anti-Glut-1 humano (US Biological), anti-RTf humano (CalBiochem), anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (PIERCE #31460), anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (PIERCE # 31430), anti-IgG de conejo Alexa flúor 488 (Molecular Probes), anti-IgG de conejo Alexa flúor 546 (Molecular Probes), anti-IgG de ratón Alexa flúor 546 (Molecular Probes).

**Cultivo Celular:** Medio Iscove`s (Gibco), PBS, tripsina-EDTA (Gibco), fungizona, penicilina, estreptomicina, (Gibco) suero fetal bovino, geneticina G418 (Gibco).

**Radioisótopos:**  $^{55}\text{Fe}$ ,  $^{55}\text{Fe}$ -hem. El  $^{55}\text{Fe}$ -hem fue obtenido a partir de la digestión de hemoglobina extraída de conejos inyectados con 74 MBq de  $^{55}\text{Fe}$  como cloruro férrico disuelto en suero fisiológico (ver Métodos 2.2.7, 2.2.8).

**Biología Molecular:** Transcriptasa reversa M-MLV, Agarosa, HindIII, NotI, Taq DNA polimerasa, bromuro de etidio, buffer PCR 10X,  $\text{MgCl}_2$  50 mM, GTP, ATP, TTP, CTP, inhibidor de ribonucleasas, RNasa H, acrilamida, bisacrilamida, azul de bromofenol, SDS, Solución de Chomzinsky, persulfato de amonio, lipofectamina, TRizol, DEPC, T4 DNA ligasa, Marcador DNA escala 100 pb y 1 Kb, E-Z Link Sulfo-NHS-LC Biotina (Pierce).

### 2.1.2 Equipos

Espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito (SIMAA 6100, Perkin Elmer), Espectrofotómetro UV-visible UV-1601 (Shimadzu), Fuente de poder Power Station 300 (Labnet), Transluminador UV (Genesys), Baño termorregulado (Mettler), Incubadora con inyección de  $\text{CO}_2$  (Shellab), Termociclador 2720 (Applied Biosystems), Centrífuga 5416 (Eppendorf), Centrífuga refrigerada (Vision), Placa calefactora (Scientific Products), Agitador/calefactor NuovaII (Thermolyne), pHímetro (Oakton), Centrífuga Spectrafuga 16M (Labnet), Balanza Mettler PM 4600 (Delta



Range), Bomba de vacío Rocker 300 (Mundolab), Campana de flujo laminar FASTER (Cientec), Contador de centelleo beta (Cobra II, Packard), Medidor Volt-Ohm epitelial (World Precision Instruments), MiniGel (Bio Rad), Trans-blot (Bio Rad), Microscopio confocal (Carl Ziess LSM).

### **2.1.3 Materiales de cultivo**

- Placas de cultivo de 6 pocillos, 35 mm diámetro, Orange Scientific (2030500).
- Placas de cultivo de 12 pocillos, 22 mm diámetro, Orange Scientific (2030400).
- Placas de cultivo de 24 pocillos, 16 mm diámetro, Orange Scientific (2030300).
- Botellas plásticas de 40 ml (25 cm<sup>2</sup>), Orange Scientific (2010100).
- Botellas plásticas de 270 ml (75 cm<sup>2</sup>), Orange Scientific (2010200).
- Insertos bicamerales Transwells, con membrana de policarbonato, tamaño de poro de 0,4 um, 6,5 mm diámetro, Costar (3413).
- Insertos tamaño de poro 0,4 um, 12 mm diámetro Millicell-PCF (PIHP01250).
- Insertos tamaño de poro 0,4 um, 30 mm diámetro Millicell-PCF (PIHP03050).
- Pipetas plásticas desechables Orange Scientific, 10 ml (PN10E1).
- Unidades de filtración, tamaño de poro 0,2 um, Orange Scientific (1520012).
- Jeringas sin aguja 20cc/ml, TERUMO.
- Pipetas Pasteur estériles TCL
- Unidad de filtración para bomba de vacío Steritop, Millipore.

#### **2.1.4 Material Biológico**

La línea celular Caco-2 de la American Type Culture Collection (#HTB37, Rockville, MD), es derivada originalmente de un cáncer de colon (Fogh y cols, 1997), y semeja un modelo de epitelio intestinal (Pitt y cols, 1987; Arturson, 1991). Estas células expresan GLUT-5, un marcador de microvellosidad de intestino delgado que no se encuentra en colon (Mahraouri y cols, 1992). Crecen en monocapas altamente polarizadas y pueden ser usadas para transporte vectorial (Audus y cols, 1990), presentan inhibición de la proliferación por contacto, forman uniones estrechas con una resistencia transepitelial de 280-320 ohm x cm<sup>2</sup> y presentan abundantes microvellosidades.

## 2.2 METODOS.

**2.2.1 Cultivo celular.** Células Caco-2 (American Type Culture Collection HTB37 Rockville, MD) fueron cultivadas en medio Iscove's (Sin Fe) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), y penicilina/estreptomicina/fungizona 1x (Gibco). Estas células pueden cultivarse en placas, botellas e insertos bicamerales. Al cultivarse en insertos exponen su lado apical al compartimiento superior y el basolateral al inferior, permitiendo el estudio de funciones celulares polarizadas. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células en botella de  $25 \text{ cm}^2$ . Se crecieron por 7 días con cambio de medio cada 2 dos días e incubaron a  $37^\circ \text{ C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Durante este período las células alcanzan confluencia, obteniéndose  $2\text{-}3 \times 10^6$  células por botella. Las células fueron tripsinizadas y resembradas en iguales condiciones.

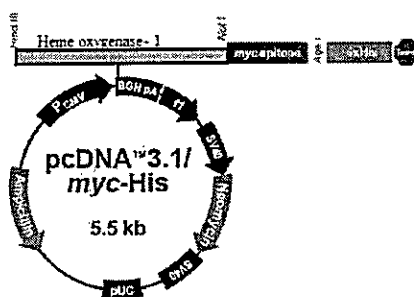
**2.2.2 Obtención de RNA de células Caco-2.** Se aisló RNA total de células Caco-2 por el método de Chomzinsky (Chomzinsky y Sacchi, 1987). Brevemente, células sembradas en botellas de  $25 \text{ cm}^2$  fueron cultivadas por 7 días con cambio de medio regular. Las células fueron soltadas con Tris salino-EDTA 1 mM y traspasadas a un tubo eppendorf de 1,5 ml. Después de centrifugar y descartar el medio se resuspendieron en 1 ml de solución de Chomzinsky y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos para permitir la disociación de los complejos núcleo-proteínas. Luego se agregó 0,2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se centrifugó nuevamente. La fase acuosa fue traspasada a un nuevo tubo. El RNA fue precipitado con 0,5 ml de

isopropanol y lavado con etanol 75%, para ser finalmente resuspendido en H<sub>2</sub>O-DEPC y guardado a -20° C.

**2.2.3 Obtención de cDNA.** El cDNA fue obtenido por transcripción reversa. La reacción se realizó agregando 5 ug de RNA y primer oligo dT (0,5 ug), se incubó a 70° C por 10 minutos y se dejó en hielo por 1 minuto. Posteriormente, se agregó 2 ul de Tampón de PCR 10x, 1 ul MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 ul dNTPs 10 mM, 2 ul DTT 0,1 M y se incubó a 42° C por 5 minutos. Luego se agregó transcriptasa reversa, se incubó por 50 minutos adicionales a la misma temperatura. La reacción fue terminada a 70° C por 15 minutos. Por último, se agregó 1 ul de RNasa H, se dejó a 37° C por 20 minutos y luego a 4° C.

**2.2.4 Amplificación del gen *ho1*.** El cDNA del gen *ho1* fue amplificado por PCR usando los ciclos: 94° C por 3 min, 94° C por 15 seg, 60° C por 1 min, 72° C por 1 min y 72° C por 10 minutos de extensión final. Las muestras se amplificaron por 35 ciclos con los partidores: 5`-g aac gag cca agc ttc ggc cgg atg-3` y 5`-g gag cca gcg cgg ccg cat aca cat-3`. Se obtuvo un fragmento de 865 pb, que fue observado en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio 0,5 ug/ml. Posteriormente el fragmento fue purificado desde un gel de agarosa por el método Gene Clean II, Bio 101 usando sílica (Sigma S-5631) como matriz de unión a DNA. La concentración final de DNA fue estimada a 260 nm.

**2.2.5 Clonación del gen *ho1* en el vector pcDNA3.1 myc-his.** El cDNA de HO1 fue clonado en el vector de expresión de mamíferos pcDNA3.1myc-his (Invitrogen). Tanto el fragmento de 865 pb como el vector fueron digeridos con las enzimas Hind III y Not I. Después de la reacción de ligación, se transformaron *E.coli* DH5α con el constructo y se seleccionaron los clones positivos por análisis de restricción del vector, para finalmente mandar a secuenciarlo. Se verificó que el inserto corresponde al marco de lectura abierto del gen *ho1* humano.



**Figura 4:** Esquema del vector pcDNA3.1/myc-His – HO1. El cDNA codificante por la proteína HO1 fue insertado en el marco de lectura con el epítope myc. Las enzimas de restricción utilizadas para digerir tanto el inserto como el vector fueron HindIII yNotI.

**2.2.6 Transfección de células Caco-2.** Células Caco-2 crecidas a sub-confluencia (50-70% de confluencia) fueron transfectadas con los vectores *pcDNA3.1myc-his-HO1* (células HO1) ó *pcDNA3.1myc-his* (células control). La transfección se realizó en presencia de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Brevemente, se incubó 1 ug de DNA con 7 ul de lipofectamina por 10 minutos y luego esta mezcla fue agregada a las células. Después de 36 horas de incubación a 37° C se retiró el medio de cultivo con la mezcla

DNA/lipofectamina y se agregó medio Iscove's 10% SFB. A las 24 horas se incubó con medio de selección (Iscove's 10% SFB más 400 ug/ml de geneticina (Gibco)).

**2.2.7 Obtención de  $^{55}\text{Fe}$ -hem.** Conejos New Zealand de 3 kilos de peso fueron adquiridos del Instituto de Salud Pública. Se les administró 74 MBq de  $^{55}\text{Fe}$  como cloruro férrico disuelto en suero fisiológico por inyección intravenosa. Quince días después fueron desangrados y las células sanguíneas radioactivas obtenidas fueron centrifugadas (1000 x g por 15 min a 22° C) y lavadas con una solución salina. Las células fueron hemolizadas por congelamiento y finalmente la solución fue liofilizada.

**2.2.8 Digestión de hemoglobina.** Se llevó a cabo la digestión parcial de hemoglobina de bovino normal o de conejo radioactiva. Para esto se hizo un homogenizado de la hemoglobina (2 mM de Fe) en agua y se bajó el pH a 2 al agregar HCl 6 N. Luego se agregaron 2 ml de una solución de pepsina 4% en HCl 0,1N y se incubó por 2 horas a 37° C en agitación. Finalmente, se subió el pH a 6,5 con NaOH 1 M.

**2.2.9 Ensayos de captación y transporte de  $^{55}\text{Fe(II)}$  y  $^{55}\text{Fe}$ -hem.** Se sembraron células Caco-2, HO1 o control en insertos bicamerales y se monitoreó la confluencia midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de los insertos cada 3 días. Las células fueron utilizadas cuando la TER alcanzó un valor superior a 250  $\Omega\cdot\text{cm}^2$ . El día del experimento se lavó las células con PBS 1x dos veces y se agregó medio de transporte MOPS salino (20 mM MOPS; 150 mM NaCl; 1,8 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4) en la cámara basolateral. Luego, se agregó la solución con el isótopo (Fe-ácido ascórbico: 25

$\mu\text{M } ^{55}\text{FeCl}_3$ ; 125  $\mu\text{M}$  ácido ascórbico diluido en MOPS salino; para Fe-hem: 50  $\mu\text{M}$  Fe-hem diluido en MOPS salino) en el compartimiento apical por diferentes tiempos. El tiempo cero corresponde a agregar el isótopo y retirarlo inmediatamente. Los insertos fueron lavados con PBS-EDTA 1 mM frío para retirar el Fe unido inespecíficamente a las membranas. Luego se colectó el medio basolateral en tubos eppendorf y se cortaron las membranas de policarbonato. Estas también fueron colocadas en tubos eppendorf, y se agregó solución Ultra Flúor a todos los tubos, para finalmente contar la radioactividad en un contador Beta.

**2.2.10 Ensayo de biotilación.** Se biotiniló la superficie celular apical ó basolateral de células Caco-2 sembradas en insertos de 30 mm de diámetro que fueron expuestas o no a Fe-hem 50  $\mu\text{M}$  por 5 días. Para esto, se lavaron los insertos 3 veces con PBS Ca/Mg ( $\text{CaCl}_2$  0,5 mM;  $\text{MgCl}_2$  1 mM) frío. Luego se agregó biotina (Sulfo-NHS-Biotina, Pierce 21217) 1 mM en el compartimiento apical o basolateral por 30 minutos a 4° C. Después de este tiempo se lavaron los insertos con PBS Ca/Mg y se volvió a agregar biotina por 30 minutos adicionales. Se lavó 3 veces con Glicina 0,1 M en PBS para bloquear la reacción y remover el exceso de biotina. Luego se cortaron las membranas, se colocaron en pocillos de 9,6  $\text{cm}^2$  y las células fueron lisadas con 1 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 20mM pH 8; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM; BSA 0,2%; Tritón X-100 1%; PMSF 2  $\mu\text{M}$ ; mezcla de inhibidores de proteasas 1X (Sigma) y se incubó 1 hora a 4° C en agitación. Las proteínas unidas a biotina fueron precipitadas incubando con 60  $\mu\text{l}$  de estreptavidina inmovilizada (Pierce N° 20347) por 1 hora a 4° C. Luego se centrifugó a 1.500 rpm por 1 minuto, se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le agregó 20  $\mu\text{l}$  de SDS 20%,

dejándolo incubar por 1 noche a 4° C en agitación. Las muestras fueron centrifugadas a 1.300 rpm por 2 minutos y se lavó 1 vez el precipitado con tampón TP II (Tris-HCl 20 mM pH 8; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM; BSA 0,2%; SDS 0,1%), luego 1 vez con TP III (Tris-HCl 20 mM pH 8; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM; BSA 0,2%) y finalmente 1 vez con TP IV (Tris-HCl 20 mM pH 8). Al precipitado se le agregó 50 ul de tampón de carga 6x, se hirvió a 100° C por 5 minutos y luego se centrifugó. El sobrenadante fue cargado en un gel SDS-PAGE al 12%.

**2.2.11 Co-immunoprecipitación de HO1 y Ireg 1.** Se estudió la posible interacción entre Ireg1 y HO1. Para esto, se sembraron células Caco-2 en botella de 25 cm<sup>2</sup> y se expusieron a Fe-hem por 5 días. El día del experimento, se lavaron 2 veces con PBS Ca/Mg (PBS 1X, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM) y se preparó un extracto celular con buffer de lisis (PBS Ca/Mg, 1% Tritón X-100, PMSF 1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas). Se incubó por 1 hora a 4° C y se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos. Al extracto de proteínas se agregó 100 ul de una solución de Proteína A-sefarosa en PBS 1:10. A 1 ug de anti-HO1 (Santa Cruz Biotech.) se agregó 30 ul de esta solución. Se incubó toda la noche (overnight, ON) a 4° C en agitación. El extracto y el anticuerpo fueron centrifugados a 14.000 rpm por 1 minuto. El sobrenadante fue incubado con el precipitado de la solución con el anticuerpo ON a 4° C en agitación. Finalmente, el extracto fue centrifugado y lavado 2 veces con buffer de lisis y 2 veces con PBS Ca/Mg. Por último, se agregó al precipitado 40 ul de buffer de carga 6x y cargó en un gel PAGE-SDS 10%. Se inmunodetectó la proteína Ireg 1 como se describe en 2.2.14.



**2.2.12 Inmunodetección de HO1.** Se realizó un extracto celular con buffer de lisis (50  $\mu$ l por cada  $10^6$  células de Tris-HCl 20mM pH 8; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM; BSA 0,2%; Tritón X-100 1%; PMSF 2  $\mu$ M; mezcla de inhibidores de proteasas 1X). La mezcla fue incubada en hielo por 15 minutos y centrifugada a máxima velocidad. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry (Lowry y cols, 1951). Se separó 50  $\mu$ g del extracto de proteínas por SDS-PAGE al 12%. Luego las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN, Perkin Elmer), la cual se bloqueó por 1 hora a temperatura ambiente con leche descremada al 5% en TBS-T 1X (Tris base 0,05 M, NaCl 0,9%, Tween 20 0,05% pH 7,6). Se detectó HO1 con un anticuerpo monoclonal (US Biological) 1:500 en TBS-T a 4° C ON. Al otro día se lavó la membrana 4 veces por 15 minutos con TBS-T y se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano 1:10000 (Pierce #31430) por 2 horas a T° ambiente. La señal fue detectada con un kit quemiluminiscente (Applichem) y autoradiografía. Las intensidades de banda fueron determinadas por densitometría utilizando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). El anticuerpo reconoce una proteína de peso molecular aparente de 32 kDa.

**2.2.13 Inmunodetección de DMT-1.** Se procedió de manera similar a lo descrito anteriormente. Este anticuerpo anti- DMT1 es un anticuerpo policlonal, dirigido contra el segmento carboxilo terminal (SKGLLTEEATRGYVK) de la proteína, 1:1000 en TBS-T a 4° C por una noche, y con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano 1:10000 por 2 horas a T° ambiente. Se detectó una proteína de peso molecular aparente de 63 kDa.

**2.2.14 Inmunodetección de Ireg1.** Se procedió de manera similar a lo descrito anteriormente. Se detectó Ireg1 con un anticuerpo policlonal dirigido contra el segmento carboxilo terminal (CGPDEKEVTKENQPNTSVV) de la proteína, 1:1000 en TBS-T a 4° C ON, y con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano 1:10000 por 2 horas a T° ambiente. Se detectó una proteína de peso molecular aparente de aproximadamente 65 kDa.

Los anticuerpos anti DMT1 y anti Ireg1 fueron donados gentilmente por el Dr. Marco Tulio Núñez, Laboratorio de Biología del Envejecimiento, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

**2.2.16 Inmunolocalización de HO1 por microscopía confocal.** Células Caco-2 fueron sembradas sobre cubreobjetos por 7 días y se expusieron o no a Fe-hem 50 uM por 5 días. El día del experimento, las células se lavaron 3 veces en PBS-MC (PBS-Magnesio/Calcio: PBS, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM) y luego se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS-MC por 15 minutos. Después se lavaron 3 veces con PBS-MC y las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0,2% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se bloquearon con PBS-MC mas BSA 0,5% 2 veces por 5 minutos, y se incubaron ON a 4° C con un anticuerpo anti- HO1 (1:500, Santa Cruz Biotechnology) en PBS con BSA 0,5% (PBS-BSA). Al otro día se lavaron 6 veces por 5 minutos con PBS-BSA y luego se incubaron ON a 4° C en oscuridad con anticuerpo anti-IgG de conejo Alexa flúor 488 (1:500, Molecular Probes). Al día siguiente se lavaron 6 veces por 5 minutos con PBS-BSA en oscuridad. Se retiraron los cubreobjetos

de las placas y se secaron al aire. Luego se montaron en portaobjetos con medio de montaje y se observaron al microscopio confocal Zeiss MP40.

**2.2.17 Co-inmunolocalizaciones de HO1/Ireg1 y HO1/GLUT 1.** Se procedió de manera similar a lo descrito, es decir, después de ser bloqueadas, las células fueron incubadas con una mezcla de anticuerpos a 4° C, ON: anticuerpo de ratón anti-HO1 humana (1:250, US Biological), anticuerpo de conejo anti-Ireg1 humana (1:500); anticuerpo de ratón anti-HO1 humana (1:250, US Biological), anticuerpo de conejo anti-Glut-1 (1:200, US Biological). Al día siguiente, las células se lavaron con PBS-BSA 6 veces por 5 minutos y se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes: anticuerpo anti-IgG de ratón Alexa 546 (1:500, Molecular Probes), con anticuerpo anti-IgG de conejo Alexa 488 (1:500, Molecular Probes) para los tres casos. Luego se procedió de manera similar a lo descrito previamente.

**2.2.18 RT-PCR semicuantitativo de FLVCR y Hefestina.** Células Caco-2 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos. Al día 2 se agregó diferentes concentraciones de Fehem en el medio de cultivo por 5 días. El día del experimento se lavó las células con PBS y se extrajo el RNA como se describió anteriormente. Para realizar los RT-PCR se utilizaron los siguientes partidores: Hefestina-s: ccagaggaggtggcctgactc y Hefestina-a: gggcatgaggaaggg-tgcag; FLVCR-s: gtatcctttctcgagcgggtg y FLVCR-a: ctggaggggtgcttgcttc. Se utilizó 1 ul de cDNA para 20 ul de reacción, que consistió en: 1 ul cDNA, 2,5 ul Tampón PCR 10X, 0,8 ul MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5 ul dNTPs (10 mM), 0,5 ul partidor 1 (10 mM), 0,5 ul partidor 2 (10 mM) y 0,5 ul Taq DNA Polimerasa. Los

programas utilizados fueron para Hefestina: 3 min a 94° C, 15 seg a 94° C, 1min a 55° C, 2 min 72° C, 10 min a 72° C, 10 min a 4° C. Para FLVCR: 3 min a 94° C, 15 seg a 94° C, 1min a 53° C, 1 min 72° C, 10 min a 72° C, 10 min a 4° C. Ambas reacciones se realizaron por 35 ciclos. Para estandarizar por cantidad total de DNA en la reacción se realizó un RT-PCR de actina con los partidores Actina-s: gacgacgagcggcgatgc y Actina-a: caggagtatgacgagtcggc, y se utilizó el programa de Hefestina. Finalmente los productos de PCR fueron cargados en un gel de agarosa 1%.

**2.2.19 Determinación de niveles intracelulares de ferritina.** La Fn intracelular fue determinada utilizando un ELISA tipo sándwich (Arredondo y cols, 1997). Para ello se utilizó anticuerpo policlonal primario anti-Fn humana (1:10000) y anticuerpo anti-Fn humana conjugado a peroxidasa (1:20000, Dako Co, Carpintería, CA).

**2.2.20 Determinación del contenido total de hierro intracelular.** Se realizó un extracto celular como se describió anteriormente, y se le determinó la concentración de proteínas. Al homogenizado se agregó un volumen de ácido nítrico al 65%, se incubó a 60° C ON, y luego el contenido de hierro fue medido en un espectrofotómetro de absorción atómica (SIMAA 6100, Perkin Elmer).

**2.2.21 Determinación del contenido de hierro reactivo (LIP).** Se determinó el contenido de Fe reactivo en células Caco-2 controles y HO1. Para ello, las células fueron crecidas en placas de 12 pocillos en medio de selección. El día del experimento las células fueron lavadas con buffer MOPS salino (MOPS 20 mM; NaCl 150 mM; CaCl<sub>2</sub>

1,8 mM, pH 7,4), y luego incubadas con Calceína-AM 0,25  $\mu$ M (Molecular Probes, Eugene, OR) en MOPS con glucosa 50 mM por 15 minutos a 37° C. Después de lavar la calceína no internalizada con MOPS sin glucosa se agregó 500  $\mu$ l de MOPS a cada pocillo, se introdujo la placa al fluorímetro y se midió la fluorescencia por 10 ciclos de 1 minuto. Luego se agregó 10  $\mu$ l de SIH 10  $\mu$ M para recuperar la fluorescencia y se midió por 10 ciclos más. La recuperación de la fluorescencia obtenida es directamente proporcional al contenido de Fe reactivo.

**2.2.22 Ensayo de transporte basolateral de Fe por apagamiento de calceína.** Para corroborar los resultados obtenidos en el ensayo de transporte de Fe a basolateral obtenidos utilizando Fe(II) y Fe-hem marcados radiactivamente se realizó un ensayo de transporte basolateral de Fe por apagamiento de calceína. Para esto, se sembraron células HO1 y control en insertos bicamerales de 1  $\text{cm}^2$ . Se monitoreó la TER hasta obtener una resistencia adecuada. El día del experimento se lavaron los insertos con MOPS salino y se agregó calceína 0,1  $\mu$ M en MOPS-glucosa en el compartimiento basolateral. En el compartimiento apical se agregó 400  $\mu$ l de MOPS-glucosa. Se midió 5 ciclos para ver la estabilización de la fluorescencia. Luego se agregó Fe-hem como fue descrito anteriormente y se midió el decaimiento de la fluorescencia por 30 ciclos de 1 minuto. Finalmente se agregó 10  $\mu$ l de SIH (salicylaldehído isonicotinoyl hidrazona) 10 mM en el compartimiento basolateral y se midió la recuperación de la fluorescencia por 5 ciclos adicionales.

**2.2.23 Determinación de la actividad de la enzima hem oxigenasa.** La actividad HO total fue determinada en células Caco-2 control y HO1. Para esto, se realizó un extracto de proteínas como fue descrito anteriormente, con buffer de lisis no denaturante (Tris-HCl 20 mM; pH 7,4 ajustado con HCl 1 M; 5 ml/L Tritón X-100; inhibidores de proteasas), y se centrifugó a 4.000 rpm por 20 minutos. Se incubaron 250 ug de extracto con 600 ul de buffer B (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM; pH 7,4 ajustado con KOH 1 M), 100 ul de hemina 150 uM, 100 ul de biliverdina reductasa (extracto crudo de hígado de rata) 100 ug/ml y 100 ul de NADPH 10 mM por 1 hora a 37° C en oscuridad. Se extrajo la bilirrubina con 1 ml de cloroformo y se agitó a temperatura ambiente por 1 hora. Se midió absorbancia a 530 nm (Coeficiente extinción molar bilirrubina 43,5 mM<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup>). La actividad enzimática se expresó como nmoles de bilirrubina/mg proteína total.

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

### 3. RESULTADOS

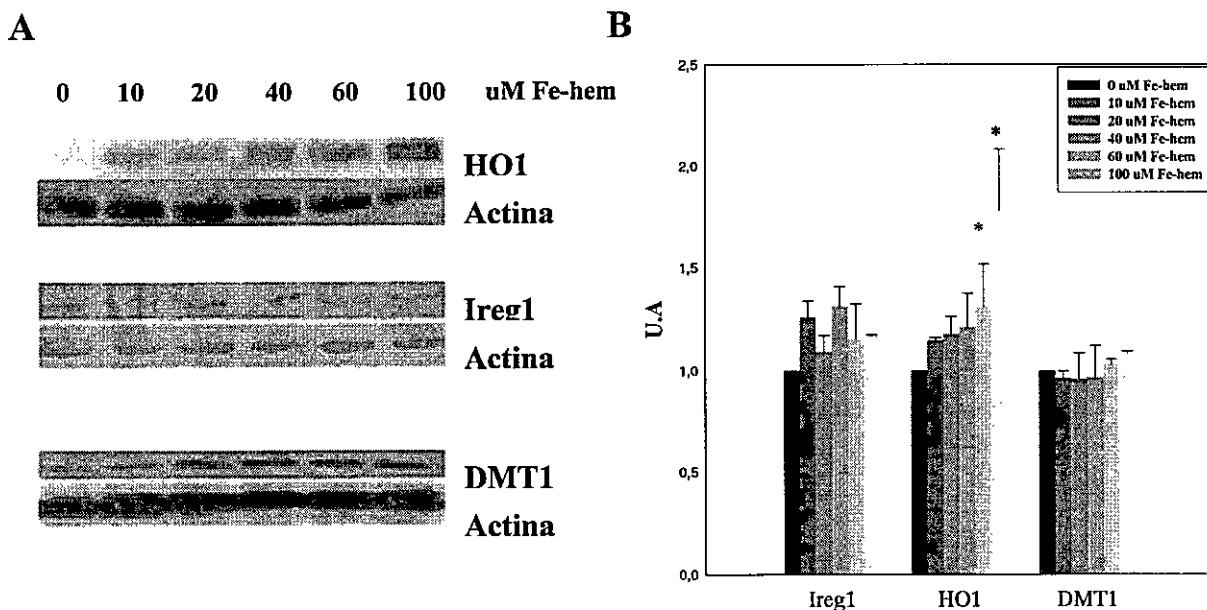
**3.1 Análisis de la expresión de DMT1, Ireg1 y HO1 en respuesta a un estímulo de Fe-hem.** Con el fin de estudiar el efecto de la exposición de Fe-hem en el metabolismo de Fe intracelular de células intestinales se agregó diferentes concentraciones de Fe-hem al medio de cultivo de células Caco-2 y se estudió la expresión de las proteínas DMT1, Ireg1 y HO1. Como es sabido, la expresión de HO1 se ve inducida en presencia de Fe-hem, sin embargo quisimos corroborar que esto ocurre en nuestro modelo y así validarlo para este estudio. Se observó un incremento en la masa de HO1 dependiente de la dosis de Fe-hem agregada (Figura 5A), siendo la expresión significativamente mayor en células expuestas a 60 y 100  $\mu$ M de Fe-hem (Figura 5B).

La inmunodetección de DMT1 en células expuestas a concentraciones crecientes de Fe-hem reveló la expresión de una proteína de un peso molecular de 63 kDa, la cual corresponde a DMT1. El análisis densitométrico mostró un aparente leve aumento en su masa al exponer las células a Fe-hem, siendo esta respuesta dosis-dependiente (Figura 5A). Sin embargo, al realizar un análisis estadístico de los resultados no se observaron cambios significativos en la expresión de la proteína frente al estímulo de Fe-hem extracelular (Figura 5B).

**Figura 5: Inmunodetección de DMT1, HO1 e Ireg1 en células Caco-2 expuestas a Fe-hem.**

**A. Inmunodetección de DMT1, HO1 e Ireg1 células Caco-2 expuestas a Fe-hem.** Extractos de células Caco-2 expuestas a 0, 10, 20, 40, 60 y 100  $\mu\text{M}$  Fe-hem por 5 días fueron resueltos por SDS-PAGE (10% para DMT1 e Ireg1 y 12% para HO1). Las proteínas fueron detectadas con anti-HO1, anti-Ireg1 y anti-DMT1 en las concentraciones que se indican en Materiales y Métodos.

**B. Análisis densitométricos de los blots en A.** La densidad de las bandas fue medida con el software Image J y luego se estandarizó con la densidad de las bandas de actina. U.A., Unidades Arbitrarias. Valores son promedio  $\pm$  D.E de 2 experimentos independientes. \* $P < 0,05$ .

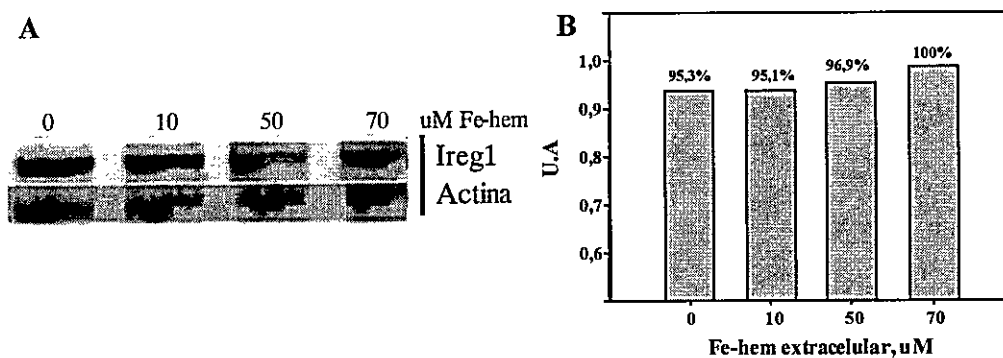


La expresión de Ireg1 no parece verse afectada mayormente por el tratamiento con Fe-hem, como muestra la Figura 5A,B. El análisis densitométrico de las bandas muestra que no hay un incremento sustancial en la masa de la proteína con el aumento de Fe-hem en el medio de cultivo (Figura 5B). Esto no concuerda con lo visto anteriormente por otros autores, los cuales sostienen que la expresión del exportador aumenta con el aumento de Fe intracelular (Martini y cols, 2002). Con el fin de confirmar estos resultados y analizar la expresión del exportador a nivel transcripcional



realizamos un ensayo de RT-PCR semicuantitativo para un segmento del cDNA de Ireg1. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 6, e indica que el nivel de transcripción del exportador no se ve alterado sustancialmente con el incremento en Fe-hem en el medio de cultivo.

**Figura 6: Estudio de la expresión de Ireg-1 a nivel de transcripción.** Células Caco-2 fueron cultivadas por 7 días en medio de cultivo suplementado con 0, 10 y 70  $\mu$ M Fe-hem.  
**A. RT-PCR semicuantitativo de Ireg1:** Se extrajo RNA y se realizó RT-PCR para detectar un segmento de Ireg1 y un segmento de Actina, como se indica en Materiales y Métodos.  
**B. Análisis densitométrico:** Se muestra la tasa de expresión de Ireg1 estandarizada por Actina.. Sobre las barras se muestra el porcentaje de la densidad máxima.



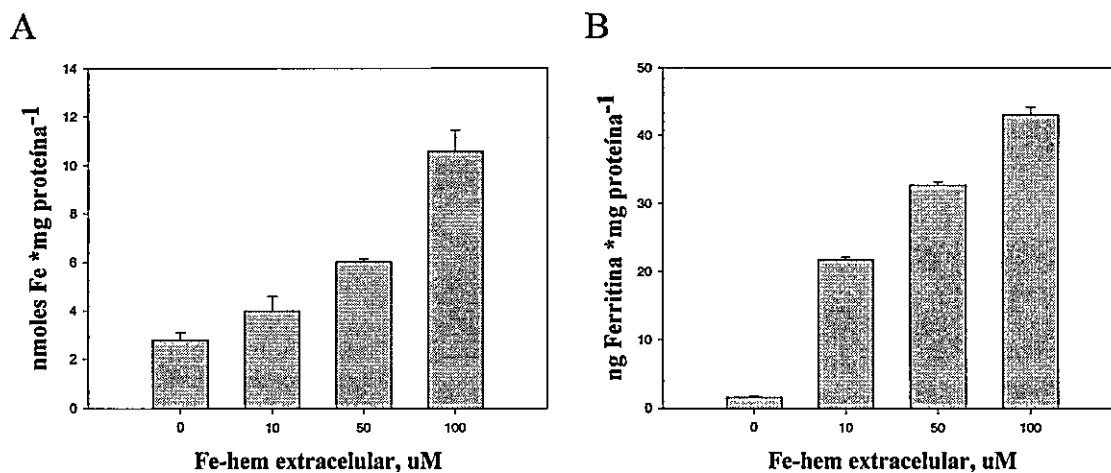
**3.2 Niveles de Fe interno y Ferritina (Fn) en células expuestas a Fe-hem.** Razonando que un incremento en la expresión de HO1 conlleva a una mayor degradación del grupo hem, se espera un aumento en los niveles de Fe libre intracelular con la inducción de la enzima. Niveles altos de Fe intracelular inactivan el sistema IRE/IRP, lo cual permite que se inicie la traducción de ferritina (Fn), proteína encargada del almacenaje de Fe. Para comprobar esto, se midió la concentración total de Fe intracelular y ferritina en células expuestas a concentraciones crecientes de Fe-hem. Se observó un incremento en la concentración intracelular tanto de Fe como de Fn (Figura 7A,B). Los valores

obtenidos para la concentración de Fe fueron de  $2,8 \pm 0,3$ ;  $4,0 \pm 0,6$ ;  $6,0 \pm 0,1$  y  $10,6 \pm 0,9$  nmoles Fe/mg proteína cuando las concentraciones extracelulares de Fe-hem fueron de 0, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Los valores obtenidos para la concentración de Fn fueron de  $1,6 \pm 0,2$ ;  $21,8 \pm 0,4$ ;  $32,7 \pm 0,5$  y  $43,1 \pm 1,1$  ng de Fn/mg proteína, para las mismas condiciones de Fe-hem extracelular indicadas anteriormente.

**Figura 7: Contenido intracelular de Fe y Ferritina en células Caco-2 incubadas con diferentes concentraciones de Fe-hem.** Las células fueron crecidas en medio Iscove's, 10% SFB por 7 días en placas de 6 pocillos. Al segundo día de cultivo se agregó Fe-hem 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ . El día del experimento se preparó un extracto celular, se le determinó concentración de proteínas y Fe y Fn. Valores son promedio  $\pm$  D.E de 3 determinaciones independientes.

**A. Fe intracelular:** Se incubó toda la noche a  $60^\circ\text{C}$  extracto celular con 1 volumen de ácido nítrico 65%. El contenido de Fe se midió por EAA.

**B. Fn intracelular:** Se determinó la concentración de Fn utilizando un ELISA tipo sándwich.



**3.3 Sobre-expresión de HO1.** Con el fin de investigar el rol de HO1 en el metabolismo de Fe en células intestinales se generó una línea estable de células Caco-2 que sobreexpresa la HO1. Para esto, se clonó el cDNA codificante para HO1 en el vector de expresión pcDNA3.1myc-His. Se transfectaron células Caco-2 con el vector

pcDNA3.1myc-His/HO1 (células HO1) y con el vector pcDNA3.1myc-His vacío (células control). Los clones positivos fueron seleccionados en medio Iscove's 10% SFB-geneticina 400 ug/ml. La sobreexpresión fue confirmada mediante Western blot, donde se detectó una proteína de peso molecular aparente de 32 kDa con el anticuerpo policlonal anti-HO1 humana (Figura 8A). El análisis densitométrico reveló que los extractos de células HO1 presentan una masa de HO1 aproximadamente un 25% mayor que la de células control (Figura 8B).

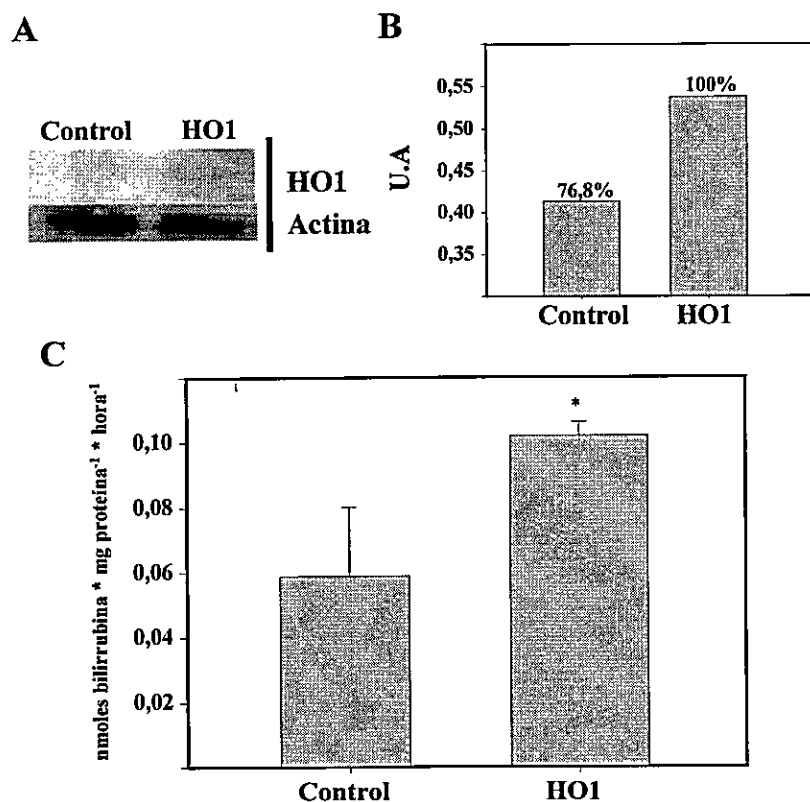
Para confirmar que la mayor masa de HO1 observada en las células HO1 se traduce en una mayor actividad enzimática, se realizó un ensayo de actividad con extractos de células control y HO1. La actividad de la proteína se expresó como nanomoles de bilirrubina/mg proteína/hora. Las células HO1 presentan una actividad significativamente mayor ( $P < 0,05$ ;  $n = 3$ ) a las células control,  $6,4 \pm 2,1$  y  $10,2 \pm 0,4$  nmoles de bilirrubina /hora/mg proteína (promedio  $\pm$  DE;  $n = 3$ ) para células control y HO1, respectivamente (Figura 8C).

**Figura 8: Células transfectadas con el cDNA *ho1* sobreexpresan la proteína HO1 y presentan una mayor actividad HO que las células control.**

**A. Inmunodetección de HO1 en células transfectadas con el vector pcDNA3.1myc-His (células Control) y transfectadas con el vector pcDNA3.1 myc-His-HO1 (células HO1):** Extracto de proteínas de células Control y HO1 fueron separados por SDS-PAGE en un gel al 12% y se detectó HO1 por Western blot con un anticuerpo anti-HO1 humana (1:500) (n = 3 experimentos independientes).

**B. Análisis densitométrico de las bandas en A.** La densidad de las bandas fue medida con el software Image J. Se estandarizó con banda de actina. U.A: Unidades Arbitrarias. Sobre las barras se muestra el porcentaje de la densidad máxima.

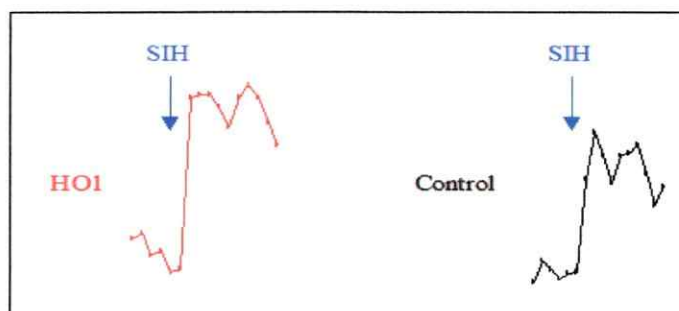
**C. Ensayo de actividad de HO1:** En extractos celulares de células control y HO1 se determinó la concentración de proteínas y 250 ug de proteína del extracto fueron incubados para determinar la actividad de la HO1. La actividad enzimática se reporta como nmoles de bilirrubina/mg proteína total. Resultados se muestran como el promedio  $\pm$  D.E; n =3. \* $P < 0,05$ .



**3.4 Medición del Fe reactivo y Fn de células que sobre-expresan HO1.** El Fe reactivo es el Fe intracelular que se encuentra unido con baja afinidad a componentes celulares,

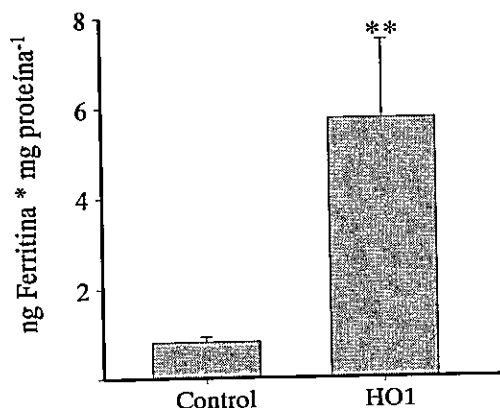
el cual es altamente disponible para las necesidades metabólicas de la célula, como almacenaje en Fn o transporte al medio basolateral. Para determinar el contenido de Fe reactivo en células que sobre-expresan HO1, realizamos una medición del pool de hierro lábil, LIP (Labile Iron Pool) en células HO1 y controles. Las células HO1 presentaron un LIP mayor que las células control ( $P < 0,05$ ; Figura 9). Los valores obtenidos fueron estandarizados por el 100% de fluorescencia medida al inicio del experimento. El valor obtenido para el LIP (promedio  $\pm$  DE;  $n = 4$ ) en las células HO1 fue de  $5,3 \pm 0,9$  unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) versus  $2,3 \pm 1,6$  UAF en las células controles.

**Figura 9: Determinación del contenido de Fe reactivo (LIP) de células HO1.** Células HO1 y controles fueron crecidas por 7 días en medio de selección. El LIP se determinó por apagamiento de la calceína. La fluorescencia fue reestablecida al agregar el quelante SIH. El nivel de LIP es proporcional al aumento de la fluorescencia inducido por SIH. La figura es representativa de la fluorescencia de calceína intracelular en las células HO1 y control.  $n = 4$ .  $P < 0,05$ .



El mayor contenido de Fe intracelular de las células HO1 debería reflejarse en mayores niveles de Fn. Por esto, realizamos medición del contenido de Fn en células que sobre-expresan HO1. La ferritina intracelulares (ng Fn/mg proteína) fue mayor en células HO1 ( $6,40 \pm 1,9$  ng) que en las células control ( $0,9 \pm 0,1$ ) ( $P < 0,01$ ; Figura 10).

**Figura 10: Fn intracelular en células HO1 y control.** La concentración de Fn intracelular fue determinada por un enzimoimmunoensayo tipo sándwich (ver Materiales y Métodos). Valores son promedio  $\pm$  D.E; n = 3. **\*\*P<0,01.**



**3.5 Estudios de captación y transporte de <sup>55</sup>Fe-hem y <sup>55</sup>Fe-ascorbato en células que sobre-expresan HO1.** Se ha reportado que HO1 cumple un rol en la salida de Fe desde algunos tejidos (Poss y Tonegawa, 1997b). Con el objetivo de investigar si la sobre-expresión de HO1 afecta el flujo de Fe-hem en enterocitos se llevaron a cabo ensayos de captación y transporte de <sup>55</sup>Fe-hem en células HO1 y control. Las células HO1 presentaron una captación de <sup>55</sup>Fe-hem significativamente mayor ( $P < 0,01$ ) que la de células control en todos los tiempos medidos (Figura 11A), siendo esta captación de  $99,2 \pm 43,0$  pmoles <sup>55</sup>Fe/mg proteína a los 30 minutos de incubación en las células control y de  $230,2 \pm 22,4$  pmoles <sup>55</sup>Fe/mg proteína en las células HO1. A los 60 minutos de incubación la captación fue de  $131,0 \pm 9,4$  pmoles <sup>55</sup>Fe/mg proteína en las células control y  $291,0 \pm 3,7$  pmoles <sup>55</sup>Fe/mg proteína en las células HO1.

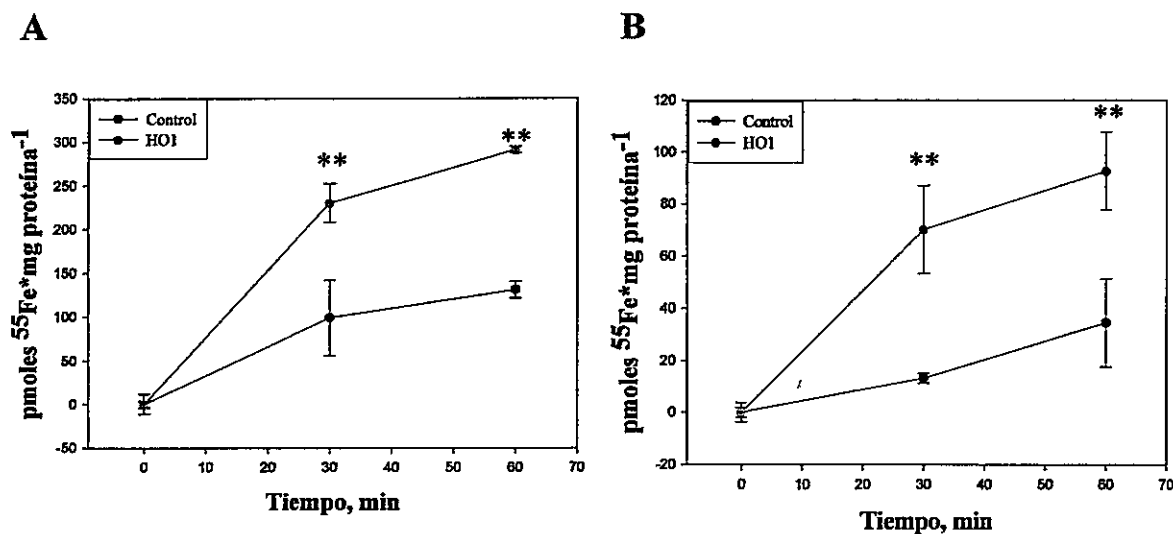
La salida de  $^{55}\text{Fe}$  a través de la membrana basolateral también se vio incrementada en células HO1, con valores de  $13,2 \pm 1,9$  pmoles  $^{55}\text{Fe}/\text{mg}$  proteína para las células control y  $70,1 \pm 16,8$  pmoles  $^{55}\text{Fe}/\text{mg}$  proteína para las células HO1 a los 30 minutos de incubación. A los 60 minutos de incubación se observaron valores de  $34,4 \pm 16,8$  pmoles  $^{55}\text{Fe}/\text{mg}$  proteína y  $92,6 \pm 14,9$  pmoles  $^{55}\text{Fe}/\text{mg}$  proteína para células control y HO1, respectivamente (Figura 11B).

En este caso, como lo que fue agregado en el compartimiento apical fue  $^{55}\text{Fe}$ -hem, era difícil poder determinar si la radioactividad medida en el compartimiento basolateral corresponde a  $^{55}\text{Fe}$  libre o a  $^{55}\text{Fe}$ -hem que haya sido translocado hacia la membrana basolateral como la molécula intacta. Para aclarar este punto decidimos medir el paso del hem hacia basolateral midiendo la absorbancia del medio basolateral a 398 nm, longitud de onda a la cual absorbe la molécula de hem. Las células control presentaron un paso de hem hacia basolateral mayor que las células HO1 ( $P < 0,05$  a los 20 minutos de incubación y  $P < 0,01$  a los 40 y 60 minutos; Figura 12). Las células controles presentaron valores de  $36,9 \pm 1,4$ ;  $129,2 \pm 4,9$ ;  $289,7 \pm 58,9$  y  $465,7 \pm 59,4$  nmoles hem/ml versus  $14,1 \pm 1,4$ ;  $51,6 \pm 4,5$ ;  $77,6 \pm 11,3$  y  $100 \pm 24,9$  nmoles hem/ml en las células HO1 a los 10, 20, 40 y 60 minutos respectivamente,.

**Figura 11: Ensayo de captación apical de  $^{55}\text{Fe}$ -hem y transporte basolateral de  $^{55}\text{Fe}$  en células control y HO1.** Células HO1 y controles fueron crecidas en insertos bicamerales en medio Iscove's 10% SFB con geneticina 400 ug/ml y se monitoreó la confluencia midiendo la TER. El día del experimento las células fueron incubadas a 37° C con  $^{55}\text{Fe}$ -hem 50 uM por diferentes tiempos por el lado apical del inserto. Los resultados se muestran como ng de  $^{55}\text{Fe}$  \* mg proteína<sup>-1</sup>. Valores son promedio  $\pm$  D.E; n = 3. \*\*P < 0,01.

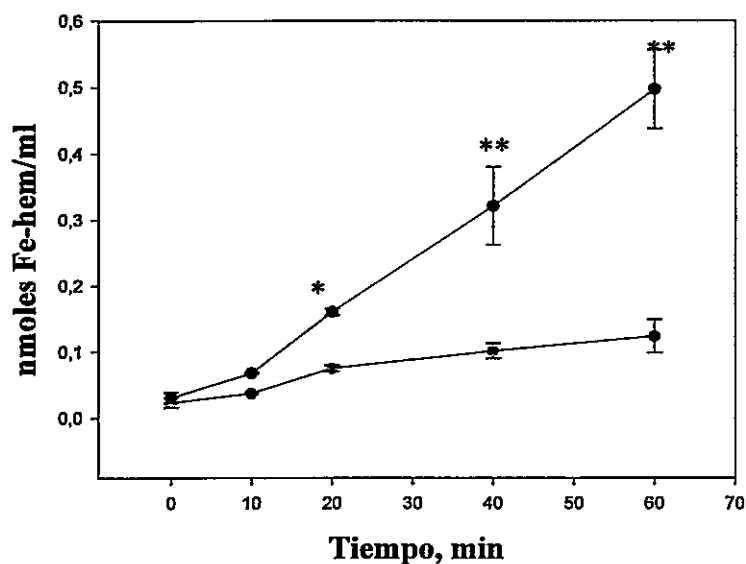
**A. Curso temporal de la captación apical de  $^{55}\text{Fe}$ -hem:** Se midió la radioactividad de las células HO1 y control en un contador Beta.

**B. Curso temporal del transporte apical-basolateral de  $^{55}\text{Fe}$ :** se colectó el medio basolateral y se midió la radioactividad como se indicó anteriormente.





**Figura 12:** Células control presentan una mayor transporte de Fe-hem hacia basolateral que células HO1. Células HO1 y control se sembraron en insertos bicamerales en medio Iscove's, 10% SFB, G418 400 ug/ml y se monitoreó la confluencia midiendo la TER. El día del experimento las células fueron incubadas a 37° C con Fe-hem 50 uM por diferentes tiempos por el lado apical del inserto. El medio basolateral fue colectado y se midió la concentración de Fe-hem espectrofotométricamente a 398 nm ( $\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Valores son promedio  $\pm$  D.E; n = 3. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .

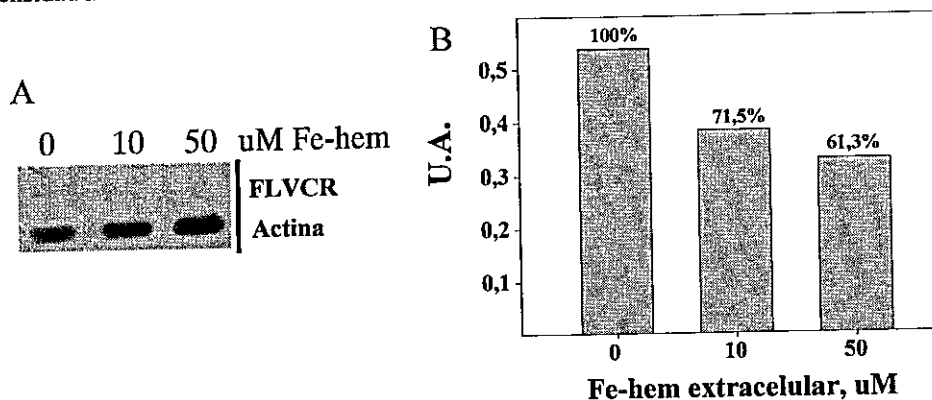


Para comprender mejor esta observación realizamos un estudio de la expresión de FLVCR (Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor) en respuesta a Fe-hem. FLVCR es una proteína de membrana cuyo rol fisiológico ha sido dilucidado recientemente, proponiéndose que corresponde a un exportador de hem citoplasmático esencial para la eritropoyesis cuyo RNAm y proteína se encuentran abundantemente en células Caco-2 y HepG2 (Quigley y cols, 2004). Para esto, se extrajo RNA de células Caco-2 expuestas a Fe-hem 10 y 50 uM por 5 días y se realizó un ensayo de RT-PCR semicuantitativo para un segmento de FLVCR. Se observó que la transcripción del exportador disminuye a medida que se incrementa la concentración de hem extracelular (Figura 13).

**Figura 13: Estudio de la expresión de FLVCR a nivel transcripcional.**

**A: RT-PCR semicuantitativo de FLVCR.** Células Caco-2 fueron cultivadas por 7 días en medio de cultivo suplementado con 0, 10 y 50  $\mu\text{M}$  Fe-hem. Se extrajo el RNA y se llevó a cabo una reacción de RT-PCR para detectar un segmento de FLVCR y un segmento de Actina, como se indica en Materiales y Métodos.

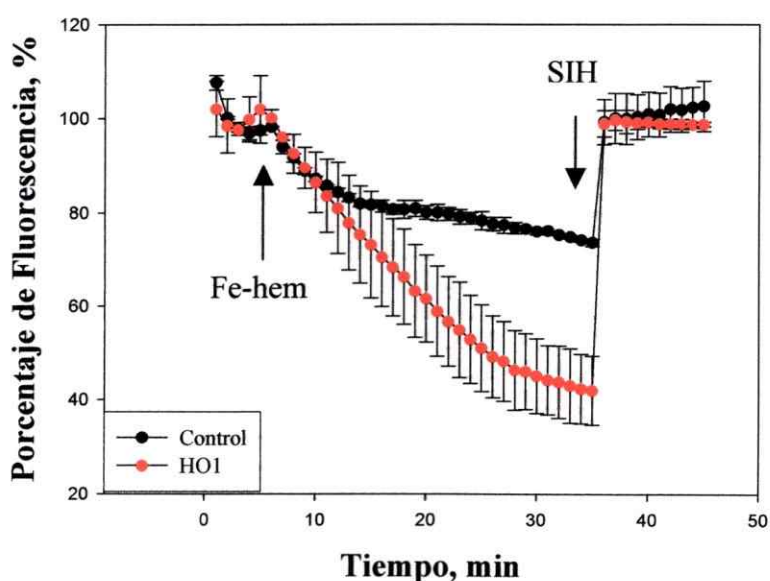
**B: Análisis densitométrico de las bandas en A.** Se llevó a cabo como se describió anteriormente. U.A, Unidades Arbitrarias. Sobre las barras se muestra el porcentaje de la densidad máxima.



Con el objetivo de confirmar que las células HO1 presentan una mayor salida de Fe libre que las células control, se realizó un ensayo de medición de Fe interno, utilizando calceína. La calceína es una sonda fluorescente capaz de unir Fe, y al unirlo su fluorescencia disminuye. Esta fluorescencia puede ser reestablecida agregando un quelante de Fe de mayor afinidad. En este ensayo, se agregó calceína 0,1  $\mu\text{M}$  en el compartimento basolateral, Fe-hem en el compartimento apical y se midió el apagamiento de la calceína cada 1 minuto. Este apagamiento fue significativamente mayor en células HO1 que en células control entre el minuto 16 y el minuto 35 ( $P < 0,05$ ), momento en el cual se agregó el quelante SIH para reestablecer la fluorescencia. Los valores obtenidos en el minuto 35 fueron de  $73,6 \pm 0,8$  % de la fluorescencia inicial para las células control y  $41,9 \pm 7,4$  % para las células HO1. Este resultado indica que

HO1 cumple un importante rol en la salida de Fe cuando las células se ven expuestas a Fe-hem (Figura 14).

**Figura 14: Medición de apagamiento de calceína en el compartimento basolateral de células HO1 y control.** Células HO1 y controles fueron crecidas en insertos bicamerales en medio Iscove's 10% SFB, geneticina 400 ug/ml. Se siguió la confluencia midiendo la TER. El día del experimento, se agregó calceína 0,1 uM en el compartimento basolateral y MOPS-glucosa en el apical. Luego de 5 ciclos (1 ciclo = 1 minuto) de estabilización de la fluorescencia se agregó Fe hem 50 uM en el compartimento apical y se midió nuevamente la fluorescencia por 30 ciclos adicionales. Finalmente se agregó SIH 10 uM en el compartimento basolateral para restablecer la fluorescencia. Valores son promedio  $\pm$  D.E; n = 4.  $P < 0,05$  para los ciclos 16-35.



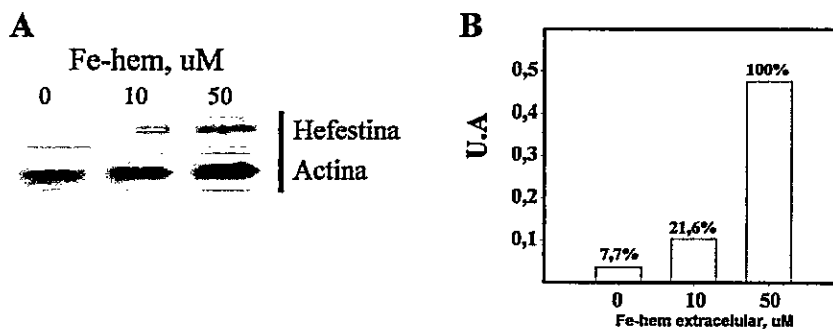
A continuación investigamos la participación de la proteína Hefestina en el aumento de la salida de Fe que ocurre al sobre-expresarse HO1. Para esto estudiamos la expresión de Hefestina frente a un estímulo de Fe-hem, ya que este estímulo induce la expresión de HO1 en condiciones fisiológicas. Realizamos un RT-PCR semicuantitativo para detectar los niveles de mRNA de la proteína y observamos un incremento en la transcripción del gen que codifica para la proteína al aumentar la concentración de Fe-hem en el medio (Figura 15).

Finalmente, quisimos explorar si HO1 cumple un rol importante en la salida de Fe cuando las células son expuestas a una fuente de Fe inorgánico. Para esto, se sembraron células HO1 y control en insertos bicamerales. La resistencia transepitelial (TER) fue monitoreada durante el experimento. El día del experimento se lavaron las células y se agregó una solución de  $^{55}\text{Fe}$ :Ascorbato (1:50, mol:mol) 25  $\mu\text{M}$  en el compartimento apical. El ascorbato se agrega a la solución de Fe, ya que es un agente reductor que lo mantiene en su estado reducido Fe(II), y lo hace más disponible para su captación. La radiactividad incorporada en las células y el presente en el medio basolateral fueron medidas en un contador Gamma. Contrariamente al resultado obtenido en el caso del Fe-hem, no se observaron diferencias significativas tanto en la captación como en el transporte de Fe entre células HO1 y control en ninguno de los tiempos medidos ( $P > 0,05$ ; Figura 16A,B).

**Figura 15: Estudio de la expresión de Hefestina a nivel transcripcional.** Células Caco-2 fueron cultivadas por 7 días en medio de cultivo suplementado con 0, 10 y 50  $\mu\text{M}$  Fe-hem.

**A) RT-PCR semicuantitativo de Hefestina:** Se extrajo el RNA y se llevó a cabo una reacción de RT-PCR para detectar un segmento de Hefestina y un segmento de Actina, como se indica en Materiales y Métodos.

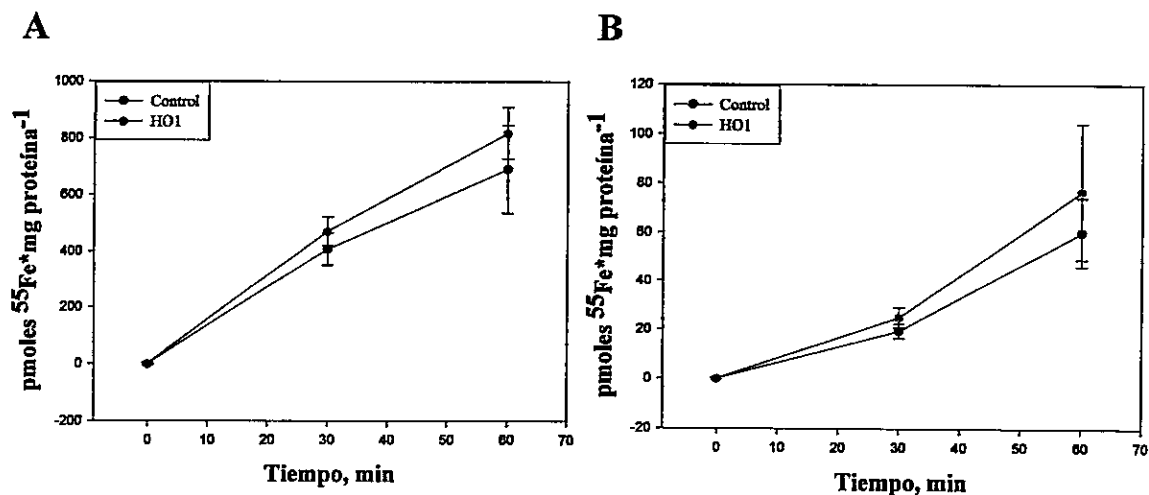
**B) Análisis densitométrico:** Se muestra la tasa de expresión de Hefestina estandarizada por Actina. Los resultados se muestran como U.A, Unidades Arbitrarias. Sobre las barras se muestra el porcentaje de la densidad máxima.



**Figura 16: Ensayo de captación apical y transporte basolateral de  $^{55}\text{Fe}$  en células HO1.** Células HO1 y controles fueron crecidas en insertos bicamerales en medio Iscove's 10% SFB con geneticina 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se monitoreó la confluencia midiendo la TER. El día del experimento las células fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  con  $^{55}\text{Fe}$ -Ascorbato 25  $\mu\text{M}$  por diferentes tiempos por el lado apical del inserto. Valores son promedio  $\pm$  D.E;  $n = 2$ .  $P > 0,05$  para todos los tiempos medidos.

**A: Curso temporal de la captación apical de  $^{55}\text{Fe}$ :** Se midió la radioactividad de las células HO1 y control en un contador Beta.

**B: Curso temporal del transporte apical-basolateral de  $^{55}\text{Fe}$ :** Se midió la radioactividad en el medio basolateral como anteriormente.



*3.6 Estudios de localización subcelular de HO1.* Ya que los resultados obtenidos indican que HO1 cumple una función tanto en la captación como en el transporte de Fe-hem quisimos investigar si estas funciones se deben a un cambio de localización de HO1 desde el retículo endoplasmático, donde se encuentra normalmente, a los sitios donde estos procesos ocurren. Con este fin, se sembraron células Caco-2 silvestres sobre cubreobjetos en medio regular. A un grupo de células se las expuso a Fe-hem 50  $\mu$ M en el medio de cultivo durante 5 días, mientras que a un segundo grupo se las mantuvo en condiciones normales. Al cabo de una semana las células se fijaron y se permeabilizaron, para luego detectar HO1 con un anticuerpo policlonal. En células no expuestas a Fe-hem la proteína se localizó perinuclearmente, asociada al retículo endoplasmático (Figura 17A y B). Sorprendentemente, la marca observada en las células expuestas a Fe-hem se localizó cercana a la membrana celular (Figura 17C y D).

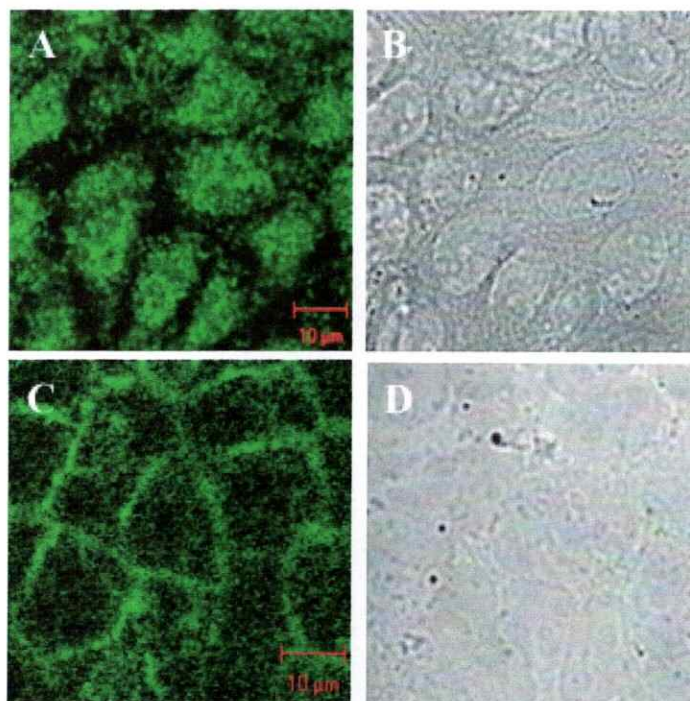
**Figura 17: Inmunolocalización de HO1 en células Caco-2 expuestas y no-expuestas a Fe-hem en el medio de cultivo.**

**A. Inmunolocalización de HO1 en células que no fueron expuestas a Fe-hem en el medio de cultivo:** Las células fueron crecidas en medio Iscove's 10% SFB por 7 días sobre cubreobjetos. El día del experimento fueron tratadas como se describe en materiales y métodos y luego incubadas con anti-HO1, seguido de un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a Alexa flúor 488. La localización de HO1 fue visualizada siguiendo la fluorescencia por microscopía confocal. Aumento, 63X.

**B. Contraste de Fase de A.**

**C. Inmunolocalización de HO1 en células expuestas a Fe-hem en el medio de cultivo:** Las células fueron cultivadas en medio Iscove's 10% SFB por 7 días sobre cubreobjetos. Al segundo día de cultivo se agregó Fe-hem 50  $\mu$ M al medio. El día del experimento fueron tratadas como se describió anteriormente. Aumento, 63X.

**D. Contraste de fase de C.**



Con el objetivo de observar con mayor detalle la localización intracelular de HO1 se sembraron células Caco-2 en insertos bicamerales de soporte claro para permitir su visualización al microscopio. En estas condiciones las células se diferencian, se

polarizan y adquieren una estructura más parecida a la adquirida en condiciones fisiológicas que cuando son sembradas sobre cubreobjetos, ya que pueden alimentarse y liberar productos de desecho basolateralmente. En la Figura 18A se observa una galería de cortes tomados a células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales de soporte claro expuestas por 5 días a Fe-hem 50  $\mu$ M, en las cuales se detectó la proteína HO1 usando un anticuerpo policlonal. Los cortes comienzan en el lado basolateral hacia el lado apical de las células, vale decir, desde el soporte hacia arriba. Considerando que el núcleo de estas células generalmente es grande y ocupa la mayor parte del volumen celular, se podría decir que la marca se observa distribuida en todo el contorno nuclear, además de estar presente en la parte basolateral. También se observa marca en el lado apical de las células. La Figura 18B muestra uno de los cortes de la galería visto de lado, donde el círculo muestra una única célula. La marca para HO1 en esta célula parece estar localizada en todo el espacio intracelular excluyendo el núcleo, y no se puede excluir la posibilidad de que se encuentre también en la membrana plasmática apical o basolateral, o en ambas. Esta localización puede ser indicativa de la presencia de HO1 en el retículo endoplasmático, al cual se encuentra anclada por el extremo carboxilo terminal, y posiblemente también en vesículas derivadas del mismo que podrían encontrarse en el citoplasma y cercanas a la membrana.



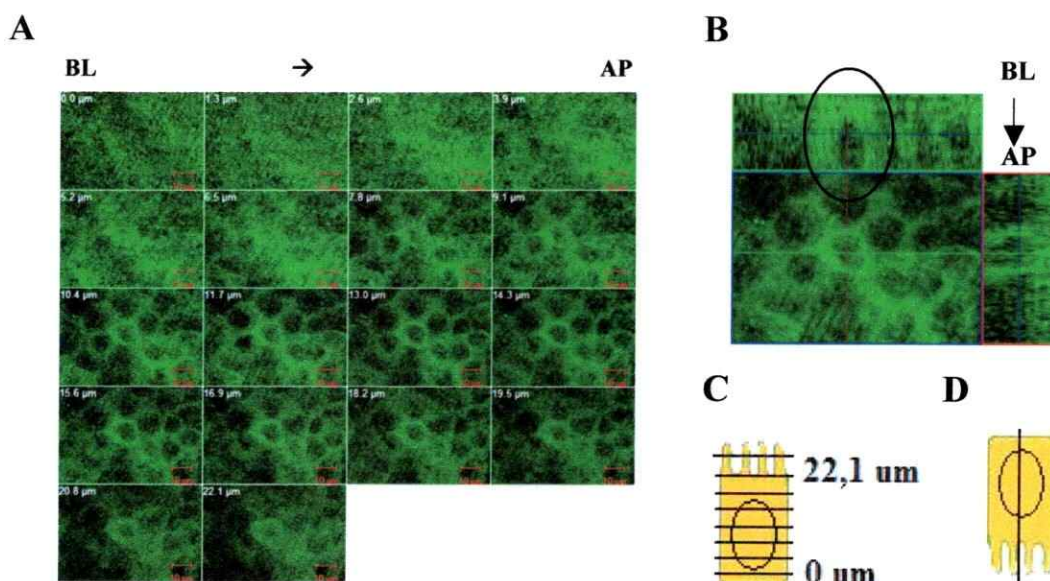
**Figura 18: Inmunolocalización de HO1 en células Caco-2 crecidas en insertos bicamerales de soporte claro y expuestas a Fe-hem 50 uM.** Las células fueron sembradas en insertos bicamerales de soporte claro y crecidas en medio Iscove's 10% SFB por 7 días. El segundo día de cultivo se agregó Fe-hem 50 uM. El día del experimento fueron tratadas como se describe en materiales y métodos y luego incubadas con anti-HO1, seguido de un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a Alexa flúor 488. La localización de HO1 fue visualizada siguiendo la fluorescencia por microscopía confocal. Aumento, 63X.

**A.** Galería de cortes de células Caco-2 crecidas en insertos bicamerales de soporte claro. Los primeros cortes corresponden al lado basolateral de la célula. BL, basolateral. AP, apical.

**B.** En recuadros, vistas ortogonales de la imagen central.

**C.** Esquema de los cortes de la galería mostrada en A.

**D.** Esquema del corte ortogonal en B.



**3.7 Distribución de HO1 en membranas apical y basolateral.** Como observamos anteriormente, no es posible descartar la posibilidad de que HO1 se encuentre inserta en vesículas del retículo endoplasmático que sean capaces de ser movilizadas frente a un estímulo de Fe-hem extracelular hacia la membrana plasmática. La presencia de la proteína en esta región podría ser un indicio de que su rol en la salida de Fe está relacionada con la modulación de la actividad de Ireg-1, especialmente si es detectada en la membrana basolateral. Con el objetivo de determinar si HO1 llega a la membrana

después de un estímulo de Fe-hem, y específicamente en cual dominio de membrana (apical o basolateral) se encuentra, realizamos un ensayo de biotilación de membranas. Este ensayo consiste en marcar con biotina todas las proteínas de la superficie de la membrana apical ó basolateral, para luego realizar un extracto celular y precipitar con estreptavidina inmovilizada exclusivamente las proteínas marcadas con biotina. Una vez aisladas las proteínas presentes en la superficie apical ó basolateral éstas se resuelven por SDS-PAGE y se detecta la proteína de interés. HO1 fue detectada únicamente en células incubadas con Fe-hem (Figura 19A), lo cual demuestra que la proteína no llega a la membrana si no es inducida con su sustrato. Se detectó la presencia de HO1 principalmente en el extracto de células biotiladas apicalmente (Figura 19A, carril AH), y también fue observada, pero en mucho menor grado, en las biotiladas basolateralmente (Figura 19A, carril BH).

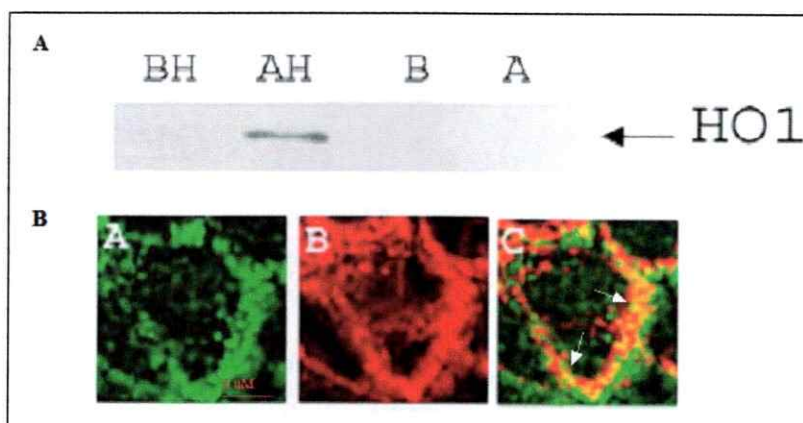
Este resultado muestra que, en respuesta a un estímulo de Fe-hem, HO1 migra principalmente hacia la membrana apical de células Caco-2, donde se encontraría “mirando” hacia el espacio extracelular. Sin embargo, nos preguntamos si no sería posible que la proteína migre también hacia la membrana basolateral, y que no haya sido detectada en el ensayo de biotilación porque está asociada internamente a la membrana, o porque se encuentra asociada a una proteína de la membrana y no directamente anclada en ella. Con el objetivo de estudiar esta posibilidad realizamos una co-inmunolocalización de HO1 con una proteína marcadora de membrana basolateral. La proteína marcadora elegida fue GLUT1 (GLUCose Transporter-1), isoforma de la familia GLUT que se localiza principalmente en la membrana basolateral de células

Caco-2 (Harris y cols, 1992). Para esto, se sembraron células Caco-2 sobre cubreobjetos y se cultivaron con Fe-hem en el medio durante 5 días. El día del experimento se fijaron, permeabilizaron y se agregó una mezcla de anticuerpos anti-HO1 hecho en conejo y anti-GLUT1 hecho en ratón. Para detectar estos anticuerpos primarios se agregó una mezcla de anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón conjugados a sondas fluorescentes verde y roja respectivamente (ver Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos muestran que las proteínas GLUT1 (verde, Figura 19B-A) y HO1 (roja, Figura 19B-B) co-localizan al exponer las células a un estímulo de Fe-hem, como se ve representado por el color amarillo (Figura 19B-C).

**Figura 19: Distribución de HO1 en células Caco-2 expuestas a Fe-hem.**

**A. Biotinilación de membrana apical y basolateral:** Células Caco-2 crecidas en insertos en medio de cultivo sin Fe-hem fueron biotiniladas apical (A) ó basolateralmente (B). Células Caco-2 crecidas en insertos y expuestas por 5 días a Fe-hem 50 uM en ambos compartimentos fueron biotiniladas apical (AH) ó basolateralmente (BH). Extractos celulares fueron precipitados con estreptavidina inmovilizada. Los precipitados fueron resueltos en gel SDS PAGE 12% y HO1 fue detectada por Western blot.

**B. Co-inmunolocalización de HO1 y GLUT1:** Células Caco-2 fueron crecidas sobre cubreobjetos en medio de cultivo con Fe-hem 50 uM por 5 días. El día del experimento las células fueron tratadas como se describe en materiales y métodos. Las flechas indican posibles sitios de co-localización. **A.** GLUT1; **B.** HO1; **C.** Combinación.



**3.8 Estudios de co-localización de las proteínas HO1 e Ireg1.** En el punto anterior hemos podido comprobar que HO1 cumple un rol fundamental en la salida de Fe a través de la membrana basolateral de enterocitos cuando se ven expuestos a una fuente de Fe-hem. El mecanismo mediante el cual la proteína es capaz de mediar esta salida aún es desconocido. Se ha propuesto la existencia de una ATPasa que transporta Fe hacia el retículo para su posterior exocitosis, la cual co-localizaría con HO1 (Barañano y cols, 2000), sin embargo no se ha explorado la función de Ireg1, el único exportador de Fe conocido, en este efecto.

Como se ha descrito en la presente investigación, la inducción de HO1 mediante la exposición de las células a Fe-hem no se ve acompañada de un cambio significativo en la expresión del exportador ni en su transcrito (Figura 5 y 6), sin embargo se ha reportado que al inducir la expresión de HO1 con cadmio sí se observa un incremento en la salida de Fe (Follet y cols, 2002). Por otro lado, se ha observado que un estímulo de Fe-hem induce, además de un incremento en la expresión de HO1, un cambio en su localización subcelular. En vista de esto nos planteamos la posibilidad de una interacción entre Ireg1 y HO1 que provoque un cambio en la actividad de Ireg1. Con este fin, se realizó una coimmunoprecipitación de las proteínas HO1 y Ireg1.

Para esto se cultivaron células Caco-2 en medio con Fe-hem por 5 días, al cabo de los cuales se realizó un extracto celular que fue tratado como se describe en Materiales y Métodos. Para detectar la interacción HO1-Ireg1 se agregó al extracto anticuerpo anti-HO1 policlonal ó con suero anti-Ireg1, respectivamente (anticuerpos

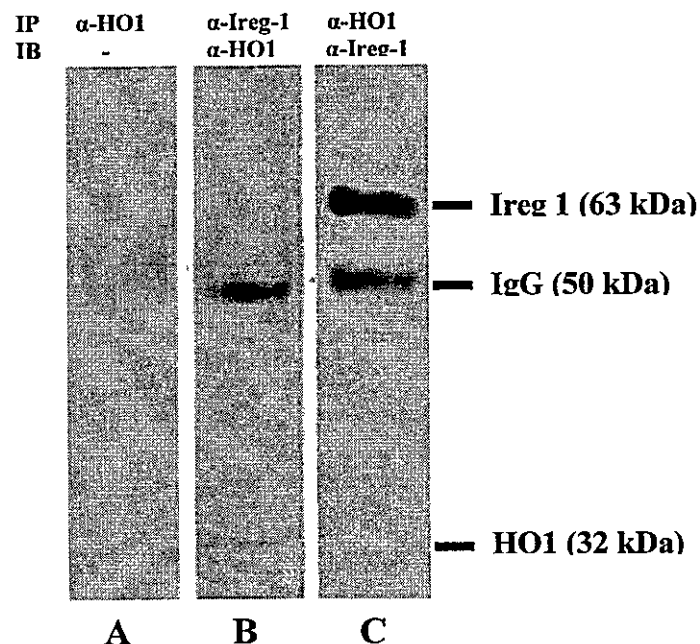
precipitantes), pre-incubados con proteína A-Sefarosa. Luego de lavar y eluir las proteínas, se separaron las proteínas por SDS-PAGE y se detectó la proteína Ireg1 o HO1 con anticuerpos específicos (anticuerpos de detección). En la Figura 20A se observa el control negativo, en el cual se precipitó con un anticuerpo anti-HO1 pero no se agregó anticuerpo de detección. La banda que se observa corresponde a la detección de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgG) del anticuerpo precipitante, de aproximadamente 50 KDa de peso molecular. En la Figura 20B se observa el resultado obtenido de la co-inmunoprecipitación Ireg1-HO1, en la cual se utilizó anti-Ireg1 como anticuerpo precipitante y anti-HO1 como anticuerpo de detección. Se observa la banda que corresponde a la IgG y una segunda banda de peso molecular aparente de 33 KDa que al parecer corresponde a HO1. Por último, se observa en la Figura 20C la co-inmunoprecipitación HO1-Ireg1, en la cual el anticuerpo precipitante utilizado fue anti-HO1 y el de detección anti-Ireg1. Similarmente a lo observado en el punto anterior, se encuentra presente una banda de 50 KDa que corresponde a la IgG y además otra banda de peso molecular mayor, que corresponde a Ireg1.

**Figura 20: Co-inmunoprecipitación de HO1 e Ireg1.** Células Caco-2 fueron cultivadas por 7 días en medio Iscove's 10% SFB. Desde el segundo día de cultivo se agregó Fe-hem 50  $\mu$ M. El día del experimento se preparó un extracto celular y se procedió como se describe en materiales y métodos.

**A. Control negativo:** El extracto fue incubado con anti-HO1 y éste fue precipitado con Proteína A-sefarosa. El precipitado fue separado por SDS-PAGE al 8%, y la membrana no fue incubada con ningún anticuerpo primario, sólo con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano. Al revelar se observó una banda de aproximadamente 50 KDa que corresponde a la cadena pesada del anticuerpo de precipitación (anticuerpo anti-HO1).

**B. Coimmunoprecipitación Ireg1/HO1:** Ireg1 fue precipitada con un anticuerpo anti-Ireg1 humano y Proteína A-sefarosa. El precipitado fue separado por SDS-PAGE al 12%, la membrana fue incubada con anti-HO1, y luego con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplada a peroxidasa de rábano. Luego de revelar se observó dos bandas; una de aproximadamente 50 KDa que corresponde a la IgG de cadena pesada del anticuerpo precipitante y una de aproximadamente 32 KDa que corresponde a HO1.

**C. Coimmunoprecipitación HO1/Ireg1:** HO1 fue precipitada con un anticuerpo anti-HO1 humano y Proteína A-sefarosa. El precipitado fue separado por SDS-PAGE al 8%, la membrana fue incubada con un anticuerpo anti-Ireg1, y luego con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplada a peroxidasa de rábano. Luego de revelar se observó dos bandas; una de aproximadamente 50 KDa que corresponde a la IgG de cadena pesada del anticuerpo precipitante y una de aproximadamente 63 KDa que corresponde a Ireg1.

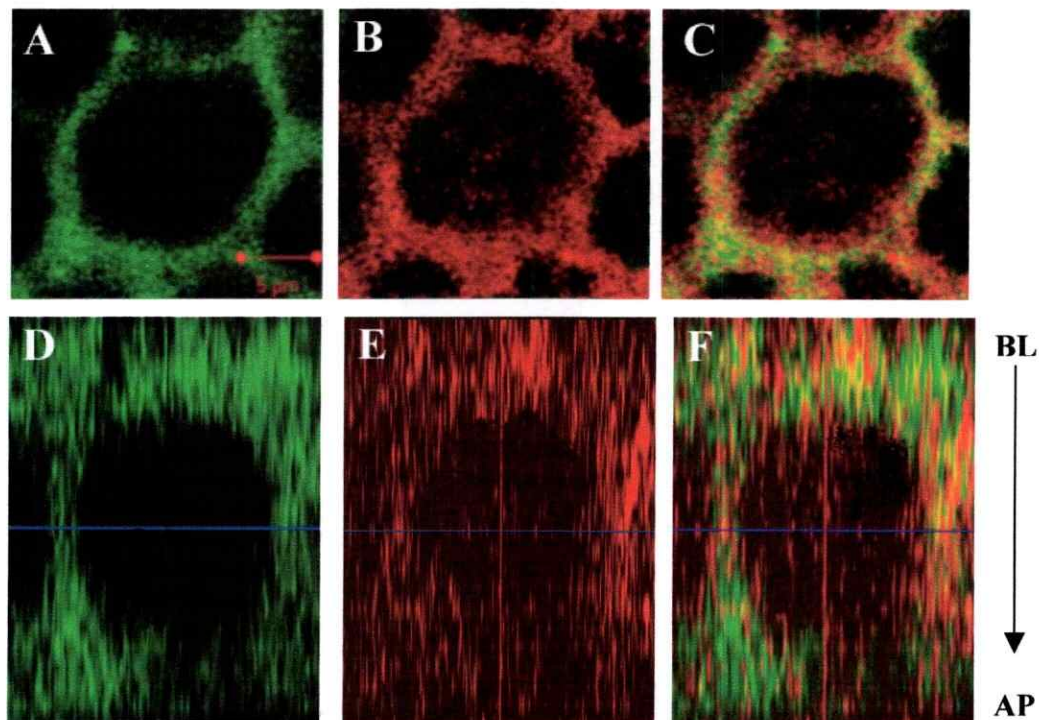


Para confirmar estas observaciones, realizamos una coimmunolocalización de las proteínas HO1 y Ireg1. Los resultados obtenidos muestran que las proteínas Ireg1

(verde, Figura 21A,D) y HO1 (roja, Figura 21B,E) co-localizan sólo parcialmente al exponer las células a un estímulo de Fe-hem (Figura 21C,F). Se ha reportado que el exportador Ireg-1, al igual que otras proteínas que participan en la homeostasis de Fe, puede ser translocado hacia otros lugares de la célula como la membrana apical (Thomas y Oates, 2004). Podemos observar una situación similar en la Figura 21E, donde se observa una vista lateral de la Figura 21A. En esta imagen se observa la presencia de Ireg-1 (en verde) tanto en la zona apical como en la parte basolateral de la célula, donde se observa la parcial co-localización con HO1 (Figura 21F). También es posible observar la presencia de HO1 en la zona apical de la célula, sin embargo no parece co-localizar con Ireg-1 en esta región. Al no ser esta co-localización exclusivamente en la membrana basolateral podemos especular que ambas proteínas pueden sufrir cambios de localización frente a un estímulo extracelular de Fe-hem y que podrían encontrarse en algún punto de su movilización intracelularmente.

**Figura 21: Co-inmunolocalización de las proteínas HO1 e Ireg1.** Células Caco-2 fueron cultivadas por 7 días en medio de cultivo Iscove's 10% SFB sobre cubreobjetos. Al segundo día de cultivo se agregó Fe-hem 50 uM, el que se mantuvo en el medio hasta el día del experimento. Ese día se procedió como se describe en materiales y métodos. Después de ser bloqueadas, las células fueron incubadas con anticuerpo de monoclonal anti-HO1 humana y anticuerpo policlonal anti-Ireg1 humana. Luego se incubaron con una mezcla de anticuerpos secundarios fluorescentes; anticuerpo anti-IgG de ratón Alexa 546 y anticuerpo anti-IgG de conejo Alexa 488.

**A.** Ireg1; **B.** HO1; **C.** Combinación de A y B. **D, E y F.** Vista lateral de A, B y C respectivamente. BL, basolateral. AP, apical.





## 4. DISCUSIÓN

En la presente tesis se estudió el efecto de la exposición a Fe-hem en el metabolismo de Fe y su relación con la expresión y actividad de la enzima hem oxigenasa en células intestinales. Para esto, se investigó la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo de Fe y los niveles de Fe y ferritina interno en respuesta a un estímulo extracelular de Fe-hem. Por otro lado, se estudió la función de HO1 en el contexto del metabolismo intracelular de Fe, para lo cual se sobreexpresó la proteína y se realizaron ensayos de flujo de Fe, utilizando Fe-hem y Fe inorgánico como fuente del mineral. Los resultados obtenidos se analizan a continuación.

### *4.1 Expresión de DMT1, IREG1 y HO1 en respuesta a un estímulo de Fe-hem.*

Al incubar células Caco-2 con concentraciones crecientes de Fe-hem se observó un incremento en la expresión de HO1, en cambio no se observó un efecto sobre la expresión del exportador de Fe Ireg1, tanto a nivel de RNAm (Figura 6) como de proteína (Figura 5), ni en la de DMT1. Por otro lado, vimos que un aumento en la concentración extracelular de Fe-hem va de la mano con un aumento en la concentración intracelular de Fe (Figura 7A). Esto es consistente con lo esperado, ya que se ha reportado que la absorción de Fe-hem es dependiente de la dosis de Fe-hem agregada (Follet y cols, 2002), de manera que a mayor concentración extracelular de Fe-hem ocurre una mayor captación del mismo. Como se expuso anteriormente, el Fe-hem es capaz de inducir su propia catálisis, al actuar como ligando para el inhibidor de la transcripción Bach1 y activando la transcripción de HO1. De esta manera, un aumento

en la concentración extracelular de Fe-hem va de la mano con una mayor captación de Fe-hem y con una mayor tasa de catálisis del mismo, liberándose el Fe contenido en la molécula y aumentando así el nivel de Fe intracelular.

El Fe liberado en la catálisis del Fe-hem formaría parte del pool común de Fe intracelular, por lo tanto, este Fe debería ser capaz de modular la actividad de las proteínas IRP de la misma forma en que lo hace el Fe inorgánico. Según nuestros resultados, la exposición a Fe-hem no parece tener el mismo efecto. Se hubiese esperado que la inducción de HO1 con su sustrato produjese una disminución en la actividad de unión a RNA de las proteínas IRP, de manera que aumentasen los niveles de Fn y disminuyesen los de las proteínas involucradas en la captación de Fe como DMT1. Se observó un aumento en los niveles de Fn (Figura 7B), lo cual concuerda con el modelo de regulación por IRPs, sin embargo no podemos atribuir completamente este efecto a una regulación de la actividad IRPs por Fe, ya que se ha reportado la presencia de elementos MARE (elementos de reconocimiento de proteínas Maf) y ARE (elementos de respuesta a antioxidantes) en el promotor de L-Fn humana que son regulados positivamente por hemina (Hintze y Theil, 2005). De esta manera, la expresión de Fn es regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, y no nos es posible determinar si su expresión es controlada por un aumento en la concentración intracelular de Fe-hem, o indirectamente por el Fe liberado de su degradación.

La expresión del transportador DMT1 no se vio significativamente afectada al aumentar la concentración de Fe-hem extracelular, a diferencia de lo que predice el

modelo de regulación por IRPs. Cabe destacar que se han encontrado al menos 4 isoformas de DMT1, las cuales difieren en su capacidad de ser reguladas por Fe (Hubert y Hentze, 2002), y cuyas funciones recién están siendo exploradas. Se ha visto que una de estas isoformas no se ve afectada por los niveles intracelulares de Fe. Con nuestros resultados no podemos decir con exactitud que isoforma del transportador es la detectada y sugerimos que esta falta de respuesta puede deberse a la isoforma de DMT1 no regulada por Fe, la cual quizás podría cumplir un rol en la movilización del Fe liberado desde el hem (ver modelo propuesto, Figura 22).

Se ha sugerido un mecanismo alternativo a HCP1 de captación de Fe-hem que involucra un proceso endocítico mediada por receptor, en base a resultados de captación de Fe-hem en estructuras vesiculares de células intestinales de perro (Parmley y cols, 1981). En este caso lo más probable es que la degradación del grupo hem ocurriese dentro de la vesícula endocítica, dada la naturaleza hidrofóbica de la molécula. El Fe liberado en la catálisis debería ser exportado hacia el citoplasma para cumplir sus funciones fisiológicas, y esta salida podría ser mediada por DMT1, lo que explicaría un aumento en su expresión. Sería interesante en el futuro, estudiar a que isoforma corresponde la proteína inducida observada en el presente trabajo.

Al contrario de lo observado por Khan y cols. (2004), no observamos cambios en la expresión del exportador *Ireg1* frente a concentraciones crecientes de Fe-hem en el medio extracelular, tanto a nivel de RNAm como de proteína. Sin embargo, esto no es tan sorprendente, ya que se ha reportado que la expresión de *Ireg1* puede ser controlada

a nivel transcripcional a pesar de poseer una secuencia IRE en su RNAm y que la regulación de la expresión de Ireg1 por Fe es tejido-dependiente. Basados en la observación que la incubación con Fe-hem provoca un aumento en la salida de Fe a través de la membrana basolateral de células intestinales (Follet y cols, 2002), y en el hecho de que Ireg1 es el único exportador de Fe conocido en estas células, cabe la posibilidad de que su actividad sea modulada de alguna manera por interacción con otra proteína o por algún mecanismo similar.

De acuerdo a lo expuesto, sugerimos que el Fe liberado por la HO1 en la reacción de catálisis del Fe-hem probablemente no pasaría como un todo a formar parte del pool común de Fe intracelular junto con el Fe inorgánico captado a través de DMT1, ya que no parece regular la expresión de proteínas de la homeostasis de Fe a través de la modulación de la actividad de las IRPs.

#### ***4.2 Sobre-expresión de HO1.***

Como se observa en la Figura 8A, la sobreexpresión de HO1 resultó ser moderada, sólo 1,5 veces la masa de la proteína en condiciones basales. No nos fue posible obtener una mayor sobreexpresión de la proteína probablemente debido a que un exceso de ésta en las etapas previas a la diferenciación provoca una disminución en la viabilidad celular. Aunque no se conocen detalles sobre la función de HO1 en estas etapas, se ha sugerido que cumple un rol en el ciclo celular de células Caco-2, sobreexpresándose en células pre-confluentes y disminuyendo esta expresión una vez que las células alcanzan la confluencia y se comienzan a manifestar las características de células epiteliales de

intestino maduras (Uc y Britigan, 2003). Por otro lado, se ha sugerido que en células diferenciadas, existe un rango de expresión de HO1 que resulta en protección celular, pero que más allá de este rango este efecto se revierte y resulta perjudicial (Suttner y cols, 1999). Las células transfectadas con el cDNA de HO1 presentaron, además de una mayor masa de la proteína, una mayor actividad de ésta, lo que permite asegurar que los resultados obtenidos se deben a una aumentada actividad de la proteína.

#### ***4.3 Medición del Fe reactivo (LIP) y Ferritina de células que sobre-expresan HO1.***

Las células que sobreexpresan HO1 presentan un LIP ligeramente mayor (Figura 9) y un contenido de Fn mucho mayor que las células control (Figura 10). Esto refleja un elevado contenido de Fe intracelular en las células transfectadas con HO1, probablemente debido a que la sobreexpresión de la proteína genera una aumentada degradación del Fe-hem. Esto provocaría que el Fe-hem intracelular en tránsito (por ejemplo, que es exportado desde la mitocondria,) sea degradado, de manera que el Fe liberado se acumule en esa forma.

#### ***4.4 Estudios de captación y transporte de $^{55}\text{Fe}$ -hem y $^{55}\text{Fe}$ -ascorbato en células que sobre-expresan HO1.***

La sobreexpresión de HO1 tendría un efecto directo en la captación de Fe-hem y la salida de Fe a través de la membrana basolateral de células intestinales (Figura 11 y 14), al contrario de lo observado en el caso del Fe inorgánico (Figura 16). HO1 es considerada la enzima limitante en la reacción de catálisis del Fe-hem, por lo que al encontrarse una mayor cantidad de proteína disponible para ejercer esta acción podría

producirse un desplazamiento de la reacción hacia los productos, de manera que disminuya la concentración de Fe-hem intracelular y se activen los mecanismos de captación de éste. Por otro lado, podría ser que HO1 este directamente involucrada en la captación de Fe-hem. Observamos que un aumento en la expresión de HO1 no tiene un efecto sobre la captación de Fe inorgánico. En condiciones fisiológicas la expresión de HO1 es inducida por su sustrato, el Fe-hem, y se sabe que la captación de éste es un proceso independiente al de Fe inorgánico, por lo que no se hubiese esperado una participación de HO1.

También se pudo observar que las células que sobreexpresan HO1 presentan una mayor salida de Fe a través de la membrana basolateral al ser expuestas a Fe-hem, lo cual confirma el rol de HO1 en la salida de Fe en células intestinales postulado por otros autores (Follet y cols, 2002). Sorprendentemente, no se observó un aumento de esta salida en células que sobreexpresan HO1 cuando son expuestas a una fuente de Fe inorgánico. Esto difiere con lo observado por Ferris y cols. (1999), que demostraron que células HEK 293 que sobreexpresan HO1 presentan una mayor salida de Fe que células control cuando son incubadas con Fe inorgánico. Nuestros resultados, por el contrario, indican que este aumento en la salida de Fe sólo ocurre cuando las células que sobreexpresan HO1 son incubadas con Fe-hem. Esto puede deberse a diferencias entre los modelos celulares estudiados, ya que Ferris y cols., utilizaron células de riñón, uno de los órganos que presenta mayor acumulación de Fe en ratones que carecen de HO1, a diferencia del tejido intestinal, que casi no presentó deposición de Fe (Poss y Tonewaga, 1997b). Estos resultados sugieren que el Fe liberado producto de la catálisis del Fe-hem

no pasa a formar parte de un pool común de Fe intracelular junto con el Fe captado como Fe inorgánico, sino que puede ser derivado a un compartimento celular diferente, o seguir una ruta distinta.

Por otro lado, como en los ensayos de transporte de Fe-hem utilizamos  $^{55}\text{Fe}$ -hem, quisimos discriminar si la radiactividad medida en alícuotas del medio basolateral del inserto correspondía a  $^{55}\text{Fe}$  o a  $^{55}\text{Fe}$ -hem que hubiese sido translocado como la molécula intacta. Nuestros resultados indican que las células control exportan considerablemente más Fe-hem que las células HO1 (Figura 12). Como vimos anteriormente, la sobreexpresión de HO1 conlleva a una mayor captación de Fe-hem (Figura 11A), y una mayor degradación de la molécula, por lo que se espera que células que sobreexpresan HO1 posean concentraciones intracelulares de Fe-hem menores. Aunque los mecanismos de transporte de Fe-hem intracelular son casi completamente desconocidos, podemos proponer que el Fe-hem puede ser translocado y exportado a través de la membrana basolateral de las células intestinales hacia la circulación, dependiendo de la disponibilidad de Fe-hem citoplasmático. Para que esto ocurra, debe haber una proporción del Fe-hem captado que no es degradado por la HO, sino que sigue otra vía intracelular. La sobreexpresión de HO1 provocaría una disminución en la disponibilidad de Fe-hem para ser exportado, por lo que se observa una mayor salida en las células control que en la que sobreexpresan la proteína.

Recientemente se ha reportado la identificación de FLVCR (Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor), un exportador de Fe-hem cuyo RNAm y proteína se

encuentran presentes abundantemente en células Caco-2 y HepG2 (Quigley y cols, 2004). La expresión de este exportador es inducida cuando aumenta la síntesis de Fe-hem, seguramente para proteger a las células de la toxicidad de éste. De la misma forma, su expresión es disminuida cuando comienza la síntesis de la globina y hemoglobina (Latunde-Dada, 2006). FLVCR previene así la citotoxicidad mediada por Fe-hem y regula sus niveles citoplasmáticos. A partir de los resultados obtenidos en el experimento anterior quisimos explorar si ocurre un cambio en la expresión de FLVCR en respuesta a un estímulo de Fe-hem extracelular. La Figura 13 muestra una disminución en la tasa de transcripción del exportador a medida que se aumenta la concentración de Fe-hem extracelular. A nuestro saber, esta es la primera vez que se observa una modulación en la transcripción de FLVCR por Fe-hem. Esta observación podría explicar la menor salida de Fe-hem en células HO1 vista anteriormente, ya que una inducción o sobre-expresión de HO1 provoca una disminución en los niveles intracelulares de Fe-hem disponibles para el transporte por FLVCR, y quizás estos bajos niveles de hem modulen la expresión del transportador.

Por último, quisimos explorar una posible participación de la ferroxidasa Hefestina en la salida aumentada de Fe de las células cuya actividad HO1 ha sido inducida con Fe-hem. Como se ha reportado anteriormente, una falta de Hefestina provoca acumulación de Fe, e incluso se ha descrito que es necesaria la presencia tanto de Ireg1 como de Hefestina para la eficiente salida de Fe desde las células. De manera interesante, la expresión de Hefestina no parece ser regulada mayormente por el estatus de Fe (Chung y Wessling- Resnick, 2003). Su localización subcelular permanece una



interrogante, ya que se ha inmunodetectado en la región supranuclear y no en la membrana basolateral de enterocitos, donde se esperaría que oxidara el Fe transportado por Ireg1 para que sea captado por la Tf circulante. Nuestros resultados indican que los niveles de transcrito de Hefestina aumentan al incrementar la concentración extracelular de Fe-hem (Figura 15). Esta es la primera vez que se describe un aumento notable en los niveles del transcrito de la proteína al exponer células intestinales a una fuente de Fe orgánico. Esto sugiere que Hefestina posee elementos reguladores en su promotor que responden a la concentración de Fe ó de Fe-hem intracelular. Este aumento en la expresión de la proteína puede ser necesario para incrementar la tasa de salida de Fe desde las células cuando éstas son expuestas a Fe-hem.

#### ***4.5 Estudios de localización subcelular de HO1.***

Se observó un cambio en la localización subcelular de HO1 al incubar las células con Fe-hem. La proteína fue detectada perinuclearmente y asociada al RE en células Caco-2 silvestres no expuestas a Fe-hem extracelular (Figura 17 C, D). Es sabido que la HO1 es una proteína microsomal que se encuentra anclada a la membrana del RE por su extremo carboxilo terminal (Schuller y cols, 1999). Sin embargo, al agregar Fe-hem al medio de cultivo fue posible detectar la proteína en todo el espacio intracelular, aparentemente incluyendo a la membrana plasmática (Figura 17A,C). Galerías de cortes transversales y longitudinales de células Caco-2 sembradas en insertos bicamerales y expuestas a Fe-hem muestran la presencia de HO1 en todo el espacio intracelular excluyendo al núcleo (Figura 18 A, B). Esta es la primera vez que se describe un cambio de localización de la proteína en células intestinales, y al encontrarse la HO1 anclada a la membrana, podría

pensarse que este cambio de localización debería darse por el transporte de vesículas desde el RE que contengan la proteína.

Luego quisimos investigar la eventual presencia de HO1 en la membrana y si esta localización era preferentemente hacia algún dominio de la membrana, es decir, hacia la membrana apical ó basolateral. Los resultados obtenidos en el ensayo de biotilación revelaron que HO1 se encuentra asociada principalmente con la membrana apical de células intestinales únicamente al exponerlas a un estímulo de Fe-hem (Figura 19A). Se ha descrito previamente una compartimentalización de HO1 en la caveola de la membrana de células endoteliales de pulmón (Kim y cols, 2004). Los autores proponen que la caveola proporciona una plataforma para la actividad HO, y demostraron la presencia además de otras enzimas que participan en la degradación del Fe-hem (biliverdina reductasa y NADPH citocromo 450 reductasa), por lo que proponen que esta cercanía espacial optimizaría esta degradación. Sin embargo, se ha demostrado que las células Caco-2 no expresan caveolina-1, proteína marcadora de caveola, y casi no poseen caveolas en su membrana (Vogel y cols, 1998). De esta manera, puede que HO1 se encuentre presente en otro tipo de estructura en la membrana apical de células intestinales, donde podría encontrarse asociada con otras proteínas involucradas en la degradación de Fe-hem, pero se necesita de mayor investigación para aclarar este punto.

Los resultados obtenidos en los experimentos de co- inmunoprecipitación y co- inmunolocalización de HO1 e Ireg1 muestran que las dos proteínas parecen co-localizar al menos parcialmente al exponer a las células a un estímulo extracelular de Fe-hem

(Figura 21). Esta co-localización es leve y parece ocurrir en la región más basolateral de la célula, aunque no directamente en la membrana, sino que probablemente ocurra en vesículas provenientes del RE en el caso de la HO1 y de la membrana plasmática en el caso de Ireg1. Se ha descubierto recientemente que Ireg1 es capaz de internalizarse al interactuar con el péptido Hecpídina en la superficie de la membrana basolateral (Nemeth y cols, 2004), y además se ha podido detectar la presencia del transportador en la membrana apical de células intestinales (Thomas y Oates, 2004). Con estos antecedentes, no es de extrañar la presencia de la proteína en otras regiones de la célula además de la membrana basolateral, y se puede especular que se al ser internalizado quedaría incluido en vesículas de membrana plasmática que podrían ser transportadas a estas regiones. De esta manera, es posible que ambas proteínas interactúen en algún compartimento intracelular cercano a la membrana basolateral, y que este evento tenga relación con el incrementado flujo de salida de Fe observado en células que sobreexpresan HO1. Con estos resultados, sin embargo, no podemos descartar que HO1 participe en algún otro proceso o interactúe con alguna otra proteína de manera que se vea favorecida la salida de Fe desde la célula intestinal.

La colocación de HO1 con GLUT1 (Figura 19B), marcador de membrana basolateral, provee evidencia para establecer la presencia de HO1 en la membrana basolateral de las células intestinales. El hecho de no haber detectado la presencia de HO1 en la membrana basolateral en el ensayo de biotinylación puede haberse debido a que la proteína no se encuentra anclada a la membrana plasmática directamente, sino que se encuentra asociada a ella a través de alguna proteína de membrana.

## 5. COMENTARIOS FINALES Y CONCLUSIONES

Los hallazgos obtenidos indican que la exposición de células tipo epitelio intestinal Caco-2 a una fuente de Fe-hem provoca alteraciones en la homeostasis de Fe intracelular que difieren de los provocados por exposición a Fe inorgánico. El Fe-hem induce la expresión de la enzima responsable de su degradación, HO1, y ésta libera el Fe contenido en la molécula. Sin embargo, suponemos que el Fe liberado no es capaz de modular la actividad del sistema IRE/IRP de la misma forma que el Fe captado en forma inorgánica, ya que al exponer las células a una mayor concentración de Fe-hem extracelular se incrementa el contenido de Fe intracelular, pero la expresión de las proteínas involucradas en la captación de Fe, como DMT1, se ve incrementada en lugar de disminuir, y la de el exportador Ireg1 no se ve alterada.

Observamos un aumento en la captación de Fe-hem y salida de Fe desde células que sobre-expresan HO1 expuestas a Fe-hem como fuente de Fe, en contraste a lo observado al exponer a una fuente de Fe inorgánico, donde no se observó diferencia en el flujo de Fe entre células transfectadas con cDNA de HO1 y células control. Este resultado, en conjunto con el anterior nos llevan a proponer que el Fe liberado de la reacción de degradación de Fe-hem sigue una vía intracelular distinta a la del Fe inorgánico, de manera que no queda disponible para regular la actividad de las proteínas IRP, y es más rápidamente evacuado de la célula que el Fe captado como en forma inorgánica.

Este trabajo provee evidencias de regulación del exportador de Fe-hem FLVCR por exposición a Fe-hem. Al parecer, altas concentraciones extracelulares de Fe-hem inducen una disminución en la expresión del exportador, probablemente por una disminución en los niveles citoplasmáticos de Fe-hem debido a la inducción de HO1, o también puede deberse a un incremento en los niveles de Fe intracelular.

Es la primera vez que se describe un cambio en la localización subcelular de HO1 en células intestinales. Este cambio, inducido por Fe-hem, puede ayudar a HO1 a realizar la función de incrementar la salida de Fe permitiéndole interactuar con el exportador Ireg1 en la región basolateral de enterocitos, y de alguna forma que esta interacción incremente la salida de Fe desde las células. El mecanismo de exportación realizado por Ireg1 es desconocido aún. Hemos visto, además, que HO1 se encuentra presente en la membrana apical, donde podría cumplir una función en la captación de Fe-hem, quizás localizándose cercanamente a otras proteínas involucradas en la degradación del Fe-hem y reduciendo así la probabilidad de incrementarse los niveles intracelulares de Fe-hem.

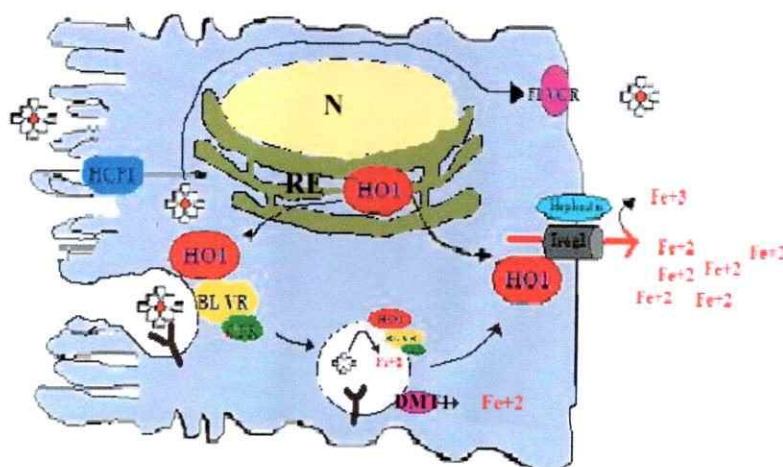
En la Figura 22 se muestra un modelo integrativo de las vías de captación, transporte y translocación de Fe inorgánico y Fe-hem en células intestinales propuesto a partir de los resultados obtenidos durante este trabajo. El Fe-hem de la dieta es internalizado por HCP1 o por un proceso alternativo de endocitosis mediada por receptor. Una vez en el interior de la célula el Fe-hem es capaz de inducir la expresión de HO1, uniéndose al factor de transcripción Bach1 q reprime su síntesis. También

induce la síntesis de Ferritina. Al inducirse la expresión de HO1 ésta es transportada unida a vesículas del RE hacia la membrana apical, donde se encarga de degradar al Fe-hem entrante y quizás co-localiza con otras proteínas involucradas en la degradación del Fe-hem, como biliverdina reductasa (BLVR) y citocromo P450 reductasa (CPR). El Fe liberado durante la catálisis del Fe-hem puede ser transportado hacia el citoplasma por una isoforma no regulable por Fe de DMT1 o permanecer vesiculado y de esta manera no quedar disponible para la regulación de la actividad de las proteínas IRP.

La proteína también es transportada hacia la región basolateral, donde interactúa parcialmente con Ireg1. Esta interacción podría aumentar la salida del Fe liberado de la reacción de catálisis del Fe-hem (Fe en rojo). No todo el Fe-hem es degradado en la reacción, ya que la molécula puede ser translocada hacia la circulación a través del exportador FLVCR.

**Figura 22: Modelo integrativo de las vías de captación, transporte y translocación de Fe inorgánico y Fe-hem en células intestinales propuesto a partir de los resultados obtenidos durante este trabajo.**

El Fe-hem de la dieta sería internalizado por HCP1. Un mecanismo alternativo comprende un proceso endocítico mediado por receptor. Una vez en el interior de la célula el Fe-hem es capaz de inducir la expresión de HO1. Al inducirse la expresión de HO1 ésta es transportada en vesículas del RE hacia la membrana apical, donde se encarga de degradar al Fe-hem entrante y quizás co-localiza con otras proteínas involucradas en la degradación del Fe-hem, como biliverdina reductasa (BLVR) y citocromo P450 reductasa (CPR). También puede ser transportada hacia la región basolateral, donde interactúa parcialmente con Ireg1, quizás aumentando la salida del Fe liberado de la reacción de catálisis del Fe-hem (Fe en rojo). No todo el Fe-hem es degradado en la reacción, ya que la molécula puede ser translocada hacia la circulación a través del exportador FLVCR.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

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

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

Alvarez-Hernandez, X., Smith, M., and Glass, J. (1998). The effect of apotransferrin on iron release from Caco-2 cells, an intestinal epithelial cell line. *Blood* 91: 3974-3979.

Bannerman, R. (1965). Quantitative aspects of hemoglobin-iron absorption. *J Lab Clin Med.* 65: 944-950.

Arturson, P.(1991). Epithelial transport of drugs in cell culture: a model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive Caco-2 cells. *J Phar Sci* 79:476-482.

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

Barañano, D., Wolosker, H. , Bae B., Barrow, K., Snyder S., Ferris, C. (2000). A Mammalian Iron ATPase Induced by Iron. *J Biol Chem.* 19; 15166-15173.

Battistini, A., Marziali, G., Albertini, R., Habetswallner, D., Bulgarini, D., Coccia, E., Fiorucci, G., Romeo, G., Orsatti, R. and Testa, U. (1991a). Positive modulation of hemoglobin, heme, and transferrin receptor synthesis by murine interferon-alpha and -beta in differentiating Friend cells. Pivotal role of heme synthesis. *J. Biol. Chem.* 266: 528-535.

Battistini, A., Coccia, E., Marziali, G., Bulgarini, D., Scalzo, S., Fiorucci, G., Romeo, G., Affabris, Testa, U, Battista Rossi and G., Peschle, C. (1991b). Intracellular heme coordinately modulates globin chain synthesis, transferrin receptor number, and ferritin content in differentiating Friend erythroleukemia cells. *Blood* 78: 2098-2103.

Breuer W, Epsztejn S, Cabantchik ZI (1995) Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron(II). *J Biol Chem* 270:24209–24215.

Carraway, M., Ghio, A., Carter, J. and Piantadosi, C. (2000). Expression of heme oxygenase 1 in the lung in chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L806-L812.

Carraway, M., Ghio, A., Tylor, J. and Piantadosi, C. (1998). Induction of ferritin and heme oxygenase-1 by endotoxin in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 275: L583-L592.

Charnay, P. and T. Maniatis. (1983). Transcriptional regulation of globin gene expression in human erithroid cell line K562. *Science* 220; 1281-1283.

Chomzynsky P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem* 162: 156–159



Chung, J. and Wessling-Resnick, M. (2003) Molecular Mechanisms and Regulation of Iron Transport. *Critical Rev Clin Lab Sci*, 40; 151-182.

Coccia, E., Profita, V., Fiorucci, G., Romeo, G., Affabris, E., Testa, U., Hentze, M., and Battistini, A. (1992). Modulation of ferritin H-chain expression in Friend erythroleukemia cells: transcriptional and translational regulation by hemin. *Mol. Cell. Biol.* 112: 3015-3022.

Conrad, M., Weintraub, L., Sears, D., Crosby, W. (1996). Absorption of hemoglobin iron. *Am J Physiol* 211: 1123-1130.

Datta, P. and Lianos, E. (1999). Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. *Kidney Int* 55: 1734-1739.

Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403:776-781.

Einsenstein, R., Garcia-Mayol, D., Pettingell, W., Munro, H. (1991). Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *PNAS* 88; 668-692.

Eyssen-Hernandez R., Ladoux, A. and Frelin, C. (1996). Differential regulation of cardiac heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor RNAm expressions by hemin, heavy metals, heat shock and anoxia. *FEBS Lett* 382: 229-233.

Ferris, C., Jaffrey, S., Sawa, A., Takahashi, M., Brady, S., Barrow, R., Tysoe, S., Wolosker, H., Barañano, D., Doré, S., Poss, K. and Snyder, S. (1999). Heme oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nature Cell Biology* 1: 152-157.

Follet, J., Suzuki, Y. and Lonnerdal, B. (2002). High specific activity heme-Fe and its application for studying heme-Fe metabolism in Caco-2 cell monolayers. *Am J Physiol* 283: G1125-G1131.

Fogh, J., Wright, W. and Loveless, J. (1997). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J of National Cancer Institute*. 58:209-214.

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

Harris, D., Slot, J., Geuze, H. and James, D. (1992). Polarized distribution of glucose transporter isoforms in Caco-2 cells. *PNAS* 89:7556-7560.

Hintze, K. and Theil, E. (2005). DNA and RNA elements with complementary responses to heme, antioxidant inducers and iron control L-ferritin expression. *PNAS* 102:15048-15052.

Hubert, N. and Hentze, M. (2002). Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: Implications for regulation and cellular function. *PNAS* 99: 12345-12350.

Igarashi, K., Hoshino, H., Muto, A., Suwabe, N., Nishikawa, S., Nakauchi, H. and Yamamoto, M. (1998). Multivalent DNA binding complex generated by small Maf and Bach1 as a possible biochemical basis for b-globin locus control region complex. *J Biol Chem* 273: 11783-11790.

Khan, Z., Barbin, Y., Cukiernik, M., Adams, P. and Chakrabarti, S. (2004). Heme-oxygenase-mediated iron accumulation in the liver. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 448-456.

Keyse, S. and Tyrrel, R. (1989). Heme oxygenase is the major 32 kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *PNAS* 86: 99-103.

Kim, H., Wang, X., Galbiati, F., Ryter, S. and Choi, A. (2004). Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J* 18: 1080-1089.

Kitamuro, T., Takahashi, K., Ogawa, K., Udono-Fujimori, R., Takeda, K., Furuyama, K., Nakayama, M., Sun, J., Fujita, H., Hida, W., Hattori, T., Shirato, K., Igarashi, K. and Shibahara, S. (2003). Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. *J. Biol. Chem.*, 278:9125-9133.

Kutty, R.K., Kutty, G., Rodriguez, I.R., Chader, G.J. and Wiggert, B. (1994) Chromosomal localization of the human heme oxygenase genes: heme oxygenase-1 (HMOX1) maps to chromosome 22q12 and heme oxygenase-2 (HMOX2) maps to chromosome 16p13.3 *Genomics*, 20. 513-516.

Latunde-Dada, G, Simpson, R. and McKie, A. (2006). Recent advances in mammalian haem transport. *Trends in Biochem Sci* (Ahead of print).

Lavrovsky, Y., Schwartzman, M., Levere, R., Kappas, A., Abraham, N. (1994). Identification of binding sites for transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *PNAS* 91:5987-5991.

Layrisse M., Cook J.D., Martínez Torres C., Roche M., Kuhn I.N., Walker R.B., Finch C.A. (1969) Food Iron absorption: a comparison of vegetables and animal foods. *Blood* 33: 430-443.

Lee GR, Nacht S, Lukens JN, Cartwright GE (1968) Iron metabolism in copper-deficient swine. *J Clin Invest* 47:2058-2069.

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

Maeshima, H., Sato, M., Ishikawa, K., Katagata, Y. and Yoshida, T. (1996). Participation of altered upstream stimulatory factor in the induction of rat heme oxygenase 1 by cadmium. *Nucleic Acids Research* 24: 2959-2965.

Mahraoui, L., Bousset, M., Dissaulx, E., Darmoul, D. and Zweibaun, A. (1992). Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine and colon. *Gastrointest Liver Physiol* 263:G312-G318.

Martini, L., Tchack, L. and Wood, R. (2002). Iron treatment downregulates DMT1 and Ireg1 mRNA expression in Caco-2 cells. *J Nutr* 132 :693-696.

McCoubey, W.K., Jr., Huang, T.J. and Mines, M.D. (1997). Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemo-protein heme oxygenase 3. *Eur J Biochem* 247:725-732.

McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 5:299-309.

Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T. and Kaplan, J.(2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306:2090-2093.

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

Ossola, J. and Tomaro, M. (1998). Heme oxygenase induction by UVA radiation. A response to oxidative stress in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 285-292.

Otterbein L, Chin BY, Otterbein SL, Lowe VC, Fessler HE, Choi AM.(1997). Mechanism of hemoglobin-induced protection against endotoxemia in rats: a ferritin-independent pathway. *Am J Physiol* 272; L268- 275.

Otterbein L., Bach F., Alam J., Soares M., Tao Lu H., Wysk M., Davis, R., Flavell, R., Choi, A. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 4; 422-428.

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

Pitt, A., Gabriels, J., Badmington, F., Mcdowell, J., Gonzalez, L. Aand Waugh, M. (1987). Cell culture on a microscopically transparent microporous membrane. *Biotechniques* 5:162-170.

Poss, K. and Tonegawa, S. (1997a). Reduced stress defense in heme oxygenase 1- deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10925-10930.

Poss, K. and Tonegawa, S. (1997b). Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *PNAS* 94: 10919-10924.

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

Rizzardini M, Terao M, Falciani F, Cantoni L. (1993). Cytokine induction of haem oxygenase RNAm in mouse liver: Interleukin 1 transcriptionally activates the haem oxygenase gene. *Biochem J* 290: 343-347.

Rizzardini, M., Zappone, M., Villa, P., Gnocchi, P., Sironi, M., Diomede, L., Meazza, C., Monshouwer, M. and Cantoni, L. (1998). Kupffer cell depletion partially prevents hepatic heme oxygenase 1 messenger RNA accumulation in systemic inflammation in mice: role of interleukin 1beta. *Hepatology* 27: 703-710.

Schuller, D.J, Wilks, A., Ortiz de Montellano, P.R., Poulos, T.L. (1999). Cristal structure of human heme oxigenase-1. *Nature Structural Biology*, 6. 860-867.

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

Shibahara, S., Muller, R. and Taguchi, H. (1987). Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem* 262:12889-12892.

Suttner, D., Sridhar, K., Lee, C., Tomura, T., Hansen, T. and Dennery, P. (1999). Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 276: L443-L451.

Tahara, T., Sun, J., Nakanishi, K., Yamamoto, M., Mori, H., Saito, T., Fujita, H., Igarashi, K., Taketani, S. (2004) Heme positively regulates the expression of b-globin at the locus control region via the transcriptional factor Bach1 in erythroid cells. *J Biol Chem* 279: 5480-5487.

Tenhunen, R., Marver, H., Schmid, R. (1969). Microsomal Heme Oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 244: 6388-6394.

Thomas, C. and Oates, P. (2004). Ferroportin/IREG1/MTP-1/SLC40A1 modulates the uptake of iron at the apical membrane of enterocytes. *Gut* 53: 44-49.

Uc, A. and Britigan. (2003). Does Heme Oxygenase 1 has a role in Caco-2 cell cycle progression? *Exp Biol Med* (Maywood). 228:590-595.

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

Vile, G.A and Tyrrel, R. (1993). Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase- dependent increase in ferritin. *J Biol Chem* 268: 14678-14681.

Vogel, U., Sandvig, K. and van Deurs, B. (1998). Expression of caveolin-1 and polarized formation of invaginated caveolae in Caco-2 and MDCK II cells. *J Cell Sci* 111: 825-32.



Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ (1999) Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 21:195-199.

Wardman, P., Candelais, L. (1996) Fenton Chemistry: an introduction. *Radiat Res* 145:523-531.

Wheby, M., Suttle, G., Ford, K. (1970) Intestinal absorption of hemoglobin iron. *Gastroenterology* 58: 647-654.

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

Yachie A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N. and Kaneda, H. (1999). Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase 1 deficiency. *J Clin Invest* 103: 129-135.

Yang F, Wang X, Haile DJ, Piantadosi CA, Ghio AJ (2002) Iron increases expression of iron-export protein MTP1 in lung cells. *Am J Physiol* 283:L932-L939.