

UCH-FC  
Biotecnología  
S218  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

EFECTO DE HEPCIDINA SOBRE LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO EN  
CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE HUMANO SH-SY5Y Y  
CARACTERIZACIÓN DE SU EXPRESIÓN EN MICROGLIAS.

Seminario de Título

Entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

**Ingeniero en Biotecnología Molecular**



Por

Daniela Sandoval Hernández

Enero, 2009  
Santiago – Chile

Director de Tesis: Dr. Marco Tulio Núñez



**EFEECTO DE HEPICIDINA SOBRE LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO EN  
CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE HUMANO SH-SY5Y Y  
CARACTERIZACIÓN DE SU EXPRESIÓN EN MICROGLIAS.**

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

**DANIELA CONSTANZA DE LOURDES SANDOVAL HERNÁNDEZ**

**Dr. Marco Tulio Núñez González**  
Director de Seminario de Título

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

**Comisión de Evaluación de la Memoria de Título**

**Dr. Christian González-Billault**  
Presidente Comisión

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal. A la derecha de la firma se encuentra un sello circular de la Facultad de Ciencias, Biotecnología Central, Universidad de Chile.

**Dr. Alejandro Roth Metcalfe**  
Corrector

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.



*En este espacio se supone que debía escribir sobre mí, pero quien mejor que mis dos mejores amigas para asumir esta tarea.*

*“Hoy tenía preparado un texto, palabras bonitas y políticamente correctas, pero sonó mi teléfono y era mi amiga que estaba feliz, casi eufórica. Entonces pensé que daban lo mismo mis ideas acerca de los sueños y los logros, lo realmente importante es que “la Dani” mi amiga de muchos momentos importantes; en el colegio, cuando entramos a la Universidad (en áreas muy distintas claro) compartimos la alegría de empezar a formar cada una nuestro futuro. Hoy es el momento en el que terminas una etapa y en él demuestras tu entereza como persona. Te enfrentaste a muchos problemas, pero al fin y al cabo fuiste capaz de superarlos, conservando tu esencia a pesar de todas las dificultades. Si bien todos somos personas únicas, con características especiales que nos diferencian de los demás, los detalles son los que te convirtieron en mi mejor amiga. La capacidad de superarte en todo lo que enfrentas, la facilidad de olvidar lo que en algún momento te hizo mal, el poder de enfrentarte a las cosas y a las personas poniendo siempre en primer lugar la amistad y los valores de los que todos hablan pero pocos practican. Cada una de esas cosas me hace sentir afortunada por tener a una persona como tu cerca (aunque suene cursi), llena de cosas buenas y que siempre será un buen ejemplo de constancia, esfuerzo y mucha responsabilidad, a quien respeto, por la lealtad con la que enfrentas la vida, admiro por todos tus logros y aquellos que están por venir, estoy segura, y por sobre todo Quiero”.*

*Lee*

*“Mi “mono” (es decir, la Dani) es una gran amiga, que siempre está cuando la necesitan, que se desveló muchas veces ayudando a otros a estudiar, escuchando y compartiendo ideas, con un gran compromiso con todos los que tuvimos la suerte de ser, además de compañeros de carrera, sus amigos. Y es también una gran persona, de profundos valores y con mucha fuerza y coraje para luchar por sus objetivos y no renunciar nunca a lo que cree que es correcto. Le encanta el arte y le apasiona la ciencia, investigar, descubrir cosas nuevas y es eso lo que, además de una gran persona, la hace una excelente científica. Sé que tu futuro estará lleno de luz, porque aunque esta se apagara, sé que descubrirías la forma de volver a encenderla, y ojalá muchas personas puedan, como yo, ver esa luz y aprender de ti, una gran amiga y un gran ejemplo”.*

*Pau*

A los que siempre  
estuvieron ahí para darme su apoyo  
y hacerme reír  
*Familia y amig@s*



## AGRADECIMIENTOS

Es difícil resumir en una página a todas las personas que me acompañaron estos últimos años y si hay alguna que se me escape del teclado, le pido mis más sinceras disculpas.

Empezaré por mis padres y familia. A pesar de que al principio estaban escépticos por mis decisiones, ahora por lo menos tienen que estar un poquito menos porque ya tienen un título para colgar en sus paredes. En un rinconcito especial quisiera agradecer a mi abuela, y a mis tíos Eduardo, Bernardita, Sonia y Alejandra, porque desde el principio creyeron en mí; no se porqué... pero así lo hicieron y eso se los agradezco mucho.

Por otra parte quiero agradecer a mi laboratorio que, con paciencia (algunos más que otros) me enseñaron todo lo que sé. Por el lado de las niñas, gracias Vicky, Pabla, Carola C, Nati, Carola G, Pame V y Carol; por el lado de los niños, gracias PnXo, Alexis, Elmer, Enrique, Andrés, Pablo Muñoz y Carlitos. Aunque algun@s ya no estén en el laboratorio, muchas gracias por todo, por la paciencia al preguntarles tantas veces las mismas cosas, por las copuchas, por los carretes de lab, por acompañarme, por ser una familia. Y por supuesto, quiero agradecer especialmente a la cabeza de esta familia, al profesor Marco Tulio Nuñez por aceptarme y aguantarme en su laboratorio.

También quiero ocupar unas líneas para agradecer al laboratorio CG y a todo su staff (Eric, Curi, Seba, Cristi, Carola, Margarita, etc) y al profesor Christian González. Gracias por la buena onda y por los insumos pedidos a última hora. También quiero agradecer al profesor Alejandro Roth, porque desde que llegó no dudo en ayudarme cada vez que lo necesité.

A pesar de que en los últimos años el laboratorio se convierte en nuestro mundo no puedo dejar de mencionar a todos aquellos que durante los casi 5 años de carrera, corrieron a mi lado. Pau, Lelo, Seba, Pato, Ema, PnXo, Coto, Ceci, Ine, Curi, Flaco, Guille, Leo, Felipe, César, Julito, Daniel, Marito, Enrq, Jorge, Charlie, Varela, Vichos, Andrés, Néstor, Mauro y muchos otros... gracias por la buena onda, por las noches perdidas de estudio y por las provechosas también, por trabajar juntos; ha sido un honor compartir mis cuadernos, risas, carretes, y muchas otras cosas con ustedes. Muchas Gracias.

Fuera de la Universidad también existieron personas que fueron mi pilar durante estos años. Gracias Lee, Mauri y Coté; a la familia de Lelo, Ceci, Ine... por ser un poquito mi familia postiza acá.

Por último, pero no menos importante quisiera agradecer a Jorge, quien en estos dos últimos años me ha acompañado y apoyado siempre, incluso sacrificando incontables fines de semana por no dejarme sola en el laboratorio, conformándose con un "me falta súper poco". Te amo mucho. A él y toda su familia, muchas gracias, en especial por hacerme sentir como una más de ustedes.

## INDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
Objetivo general	17
Hipótesis de trabajo	17
Objetivos específicos	17
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	18
<b>2.1 MATERIALES</b>	18
2.1.1 Reactivos generales	18
2.1.2 Cultivo celular	18
2.1.3 Biología Molecular	18
2.1.4 Líneas celulares	19
2.1.5 Cultivo primario	19
2.1.6 Equipos	19
2.1.7 Materiales de cultivo	20
2.1.8 Anticuerpos	20
<b>2.2 MÉTODOS</b>	21
2.2.1 Cultivo celular	21
2.2.2 Cultivo primario de corteza de rata	22
2.2.3 Obtención de ARNm y ADNc	24
2.2.4 Obtención extracto de proteínas	25
2.2.5 Determinación de la concentración de proteínas	26
2.2.6 Obtención de medio condicionado enriquecido con hepcidina desde línea celular de hepatocito humano (HepG2)	27
2.2.7 Transfección de línea celular de riñón humano (HEK 293) con Lipofectamina 2000	27
2.2.8 Obtención de medio condicionado enriquecido con hepcidina recombinante	28
2.2.9 Purificación parcial de hepcidina recombinante	29
2.2.10 Ensayo de actividad antimicrobiana	29
2.2.11 Ensayo de actividad específica de hepcidina parcialmente purificada	29
2.2.12 Medición de la incorporación de hierro utilizando el isótopo $^{55}\text{Fe}$	30
2.2.13 Medición de la salida de hierro utilizando el isótopo $^{55}\text{Fe}$	31
2.2.14 Ensayo de RT-PCR semicuantitativo	32
2.2.16 Ensayo de Inmunodetección por Western blotting y ELISA	35
2.2.17 Ensayos de Inmunocitoquímica	37
2.2.18 Análisis de imágenes mediante microscopia confocal	38
2.2.19 Análisis estadístico	38
<b>3. RESULTADOS</b>	39
3.1 Obtención de medio condicionado enriquecido en hepcidina	39
3.1.1 Medio condicionado de células HepG2	39
3.1.2 Medio condicionado de células HEK 293 enriquecidos en hepcidina recombinante	40



3.1.2.1	RT-PCR HEK Heph y HEK TOPO	41
3.2	Purificación parcial de hepcidina recombinante	42
3.2.1	Purificación en columna de intercambio catiónico	42
3.2.2	Actividad antimicrobiana de hepcidina recombinante purificada	43
3.2.3	Inmunodetección de hepcidina mediante técnica de ELISA	45
3.2.4	Ensayo de actividad específica de hepcidina parcialmente purificada	46
3.3	Caracterización del efecto de hepcidina en la homeostasis del hierro en neuroblastomas de humano	47
3.3.1	Hepcidina induce un aumento en la incorporación de hierro marcado radiactivamente ( $^{55}\text{Fe-NTA}$ ) en células SH-SY5Y	47
3.3.2	Hepcidina induce una disminución en la salida de hierro marcado radiactivamente ( $^{55}\text{Fe-NTA}$ ) en células SH-SY5Y	49
3.4	Expresión de proteínas involucradas en la homeostasis del hierro	50
3.4.1	Hepcidina modula la expresión de proteínas involucradas en la homeostasis del hierro	50
3.4.2	Expresión de ARNm de <i>dmt1</i>	51
3.5	Caracterización de la expresión y el efecto de hepcidina en cultivo primario de cerebro de rata	52
3.5.1	Aislamiento de astrocitos y microglías desde cultivo mixto de glías obtenidas de cerebro de rata	52
3.5.2	Expresión de ARNm de hepcidina en astrocitos y microglías	53
3.5.3	Efecto del hierro en cultivo primario de microglías	54
4.	<b>DISCUSION</b>	55
4.1	Obtención de hepcidina parcialmente purificada	55
4.2	Aumento de la incorporación de hierro marcado en células SH-SY5Y por efecto de hepcidina	57
4.3	Expresión de ARNm de hepcidina en astrocitos y microglías	58
4.4	Efecto del hierro en cultivo primario de microglías	59
5.	<b>CONCLUSIONES</b>	61
6.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	63





## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo de la estructura tridimensional de hepcidina de humano	7
<b>Figura 2.</b> Modelo hipotético para el papel de hepcidina como regulador clave de la homeostasis del hierro	8
<b>Figura 3.</b> Obtención de medio condicionado enriquecido en hepcidina desde células HepG2	39
<b>Figura 4.</b> Obtención de medio condicionado enriquecido en hepcidina desde células HEK Heph y HEK TOPO	40
<b>Figura 5.</b> Esquema del vector pcDNA3.1/Hepcidina-V5-His-TOPO transfectado en células HEK293	41
<b>Figura 6.</b> Expresión de ARNm de hepcidina en células HEK293 transfectadas con los vectores pcDNA3.1/Hepcidina-V5-His-TOPO y pcDNA3.1/V5-His TOPO, evidenciados por RT-PCR semicuantitativo	42
<b>Figura 7.</b> Purificación parcial de hepcidina proveniente de medio condicionado de células HEK Heph	43
<b>Figura 8.</b> Las fracciones obtenidas de la purificación parcial de hepcidina mediante Cromatografía de intercambio catiónico tienen actividad microbiciada	44
<b>Figura 9.</b> Las fracciones provenientes de la cromatografía de intercambio catiónico que presentan actividad microbiciada presentan inmunoreactividad contra hepcidina en ensayo ELISA	45
<b>Figura 10.</b> Actividad microbiciada de hepcidina parcialmente purificada es específica	46
<b>Figura 11.</b> Hepcidina, proveniente de células HepG2, induce un aumento en la incorporación de hierro marcado radiactivamente en células SH-SY5Y,	

de forma tiempo y dosis dependiente	47
<b>Figura 12.</b> Hepcidina recombinante, parcialmente purificada, induce un aumento en la incorporación de hierro marcado radiactivamente en células SH-SY5Y	48
<b>Figura 13.</b> Hepcidina induce una disminución en la salida de hierro marcado radiactivamente en células SH-SY5Y	49
<b>Figura 15.</b> Hepcidina induce una disminución de la proteína exportadora de hierro IREG1, pero no del importador de hierro DMT1	50
<b>Figura 16.</b> Hepcidina no induce cambios en la expresión del ARNm que codifica para las isoformas de <i>dmt1</i> en células SH-SY5Y	51
<b>Figura 17.</b> Separación de células microgliales desde cultivo mixto de glías de rata	52
<b>Figura 18.</b> Células microgliales y astrocíticas expresan el ARNm de hepcidina	53
<b>Figura 19.</b> Efecto del hierro en morfología de células microgliales	54
<b>Figura 18.</b> Mecanismo propuesto sobre la relación entre hepcidina, la homeostasis del hierro y el sistema inmune en un modelo neuronal	60



## LISTADO DE ABREVIATURA

BCA	: Bicinchoninic acid
BSA	: Bovin Serum Albumin (Albumina sérica de bovino)
ADNc	: Acido desoxiribonucleico complementario
ARNm	: Ácido ribonucleico mensajero
CIC	: Cromatografía de intercambio catiónico
Da	: Dalton
D.E	: Desviación estándar
DEPC	: Dietil pirocarbonato
DIV	: Días <i>in vitro</i> .
DMEM	: Medio mínimo esencial modificado Dubelco
DMT1	: Divalent metal transporter 1 (Transportador de metales divalentes 1)
DNAsa	: Enzima capaz de degradar DNA
EDTA	: Acido etilendiaminotetracético
EP	: Enfermedad de Parkinson
Fe	: Hierro
$^{55}\text{FeCl}_3$	: Isótopo de hierro-55 en la forma de tricloruro férrico
Fn	: Ferritina
G418	: Gentamicina
HBSS	: Hank's Balanced Salt Solution
Hepc	: Hepcidina
HFE	: Proteína mutada en la Hemocromatosis Hereditaria
HH	: Hemocromatosis Hereditaria
His	: Cola de poli-histidina

IRE	: Iron response element (elementos de respuesta a hierro)
Ireg1	: Iron regulated transporter 1 (Transportador regulado por hierro 1)
IRP	: Iron response protein (proteínas de respuesta a hierro)
LB	: Medio de crecimiento bacteriano (Luria Bertani)
LPS	: Lipopolisacárido (Escherichia coli)
MEM	: Medio mínimo esencial
MTT	: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio
NTA	: Nitrilotriacetato
O.N.	: Over Night (Toda la noche)
Oligo dT	: Partidor para generar ADNc a partir de la técnica RT-PCR
OptiMEM	: Medio optimizado para cultivo reducido en suero
Pb	: Pares de bases nucleotídicas
PBS	: Phosphate buffered saline (Medio salino fosfato)
PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
RNAse	: Enzima capaz de degradar ARN
ROS	: Reactive oxygen species (Especies reactivas de oxígeno)
Rpm	: revoluciones por minuto
RT-PCR	: Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
Sefarosa-CNBr	: Sefarosa activada con bromuro de cianógeno
SP-Sefarosa	: Sulfopropil sefarosa
FBS	: Fetal bovin serum (Suero fetal bovino)
T7	: Partidor universal
TAE	: Tris acetato EDTA

TBS : Tris buffered saline (Buffer tris salino)  
TCA : Tricloroacetic acid (Ácido tricloro acético)  
TfR : Receptor de transferrina  
TOPO : Gen que codifica para la enzima Topoisomerasa  
Tween 20 : Polyoxyethylene sorbitan monolaurate  
V5 : Epítopo V5

## RESUMEN

El hierro es un elemento químico esencial, que participa en múltiples procesos fisiológicos dentro de los que destacan el transporte e intercambio de oxígeno, su función como cofactor de numerosas enzimas y el proceso de transferencia de electrones en la cadena de transporte de electrones. Muchos de estos procesos se llevan a cabo gracias a la alta actividad de intercambio de electrones que posee. Esta esencialidad se contrapone con su gran toxicidad cuando está en un estado redox-activo en el interior celular, es por esto que una correcta regulación de la homeostasis del hierro es indispensable. El péptido catiónico hepcidina tiene el atributo de ser el regulador maestro de la homeostasis del hierro. Hpcidina, cuya forma madura es un péptido de 25 aminoácidos, se expresa principalmente en el hígado aunque se ha documentado su expresión en diversos órganos, entre los que destaca el cerebro. Se ha descrito que el efecto de hepcidina es tejido-dependiente, ya que genera efectos contrarios en los dos tipos celulares más estudiados hasta el momento. En células mieloides como macrófagos, hepcidina provoca un aumento del hierro intracelular induciendo la degradación del transportador de salida IREG1; en tanto que en células del epitelio intestinal hepcidina disminuye la expresión del transportador de entrada DMT1. La combinación de estos efectos resulta en la disminución de los niveles de hierro circulante. No hay evidencias en la literatura sobre el efecto de este péptido en el sistema nervioso central. Esto es interesante si se considera que varias enfermedades neurodegenerativas se asocian tanto a cuadros inflamatorios como a una pérdida de la homeostasis del hierro. El ejemplo más conocido de esta asociación es la enfermedad de Parkinson, cuya etiología es aún desconocida. Hpcidina podría ser un nexo, hasta ahora insospechado, entre inflamación y hierro, ya que su expresión se induce por estímulos

inflamatorios. En este trabajo se describe el efecto de hepcidina en neuroblastomas humanos SH-SY5Y. Encontramos que hepcidina produjo acumulación de hierro por inhibición de la salida de este de las células. Este efecto fue atribuido a la disminución en la masa del transportador de salida IREG1, posiblemente por inducción de su internalización y posterior degradación. Además se estableció que posibles fuentes de este péptido en el cerebro son las células microgliales y las células astrocíticas. El conjunto de estos resultados sugieren una secuencia nociva en la que un estímulo inflamatorio induce la activación de astrocitos y microglías y un aumento de la secreción de hepcidina, la que induciría la inhibición de la salida de hierro en neuronas con su consiguiente acumulación y daño oxidativo.

## ABSTRACT

Iron is an essential element involved in many vital physiological processes, mainly in oxygen transport and exchange, acting as a co-factor of numerous enzymes and participating in various electron-transfer reactions. Many of these processes occur due to the high electron exchange activity of iron. This quality is opposed with its huge toxicity when it is in an active-redox state in the cell. For this reason, an adequate regulation of iron homeostasis is essential for life. Hepcidin, a 25 amino acid cationic peptide, is the master regulator of iron homeostasis. This peptide is expressed mainly in the liver, although there are several reports indicating an expression in other organs, including the brain. It has been reported that the effect of hepcidin is tissue-dependent, because it generates opposite effects in two of the most studied cell types. In myeloid cells, such as macrophages, it causes an increase in intracellular iron by inducing the degradation of the exit transporter IREG1; while in intestinal epithelia cells it decreases the expression of the uptake transporter DMT1. The combination of these effects results in a decrease of iron levels in the serum circulation. So far, there is no reported evidence in the literature about the effect of this peptide on the central nervous system. Such knowledge could be quite relevant, considering that multiple neurodegenerative diseases are associated both with inflammatory processes and iron homeostasis derregulations. Particularly in the case of Parkinson's disease, which has an unknown etiology but with iron deposits associated to cell death. Hepcidin could be a link between inflammation and iron because its expression is induced by inflammatory stimuli, resulting in iron homeostasis modifications. In the work presented here, we describe the effect of hepcidin on a human neuroblastoma, the SH-SY5Y cells. We found that hepcidin induced iron accumulation by inhibiting its exit from the cells, an effect attributed to the decrease of the iron exporter IREG1, possibly through induction of internalization and

subsequent degradation. Complementing this, we described the CNS residing hepcidin sources: the microglial and astrocytes cells; both highly resolved in inflammatory responses and Parkinson's disease. Our results suggest a harmful sequence, where an inflammatory stimulus induces microglial and astrocyte activation, increasing hepcidin secretion, which in turn could inhibit iron exit from neurons with the consequent accumulation, oxidative damage and cell death.

## INTRODUCCIÓN

El hierro es un elemento químico simbolizado como Fe. Su número atómico es 26 y posee dos valencias, +2 y +3. De esta forma, el hierro forma compuestos ferrosos (como el óxido ferroso) si presenta valencia +2 y férricos (como el óxido férrico) cuando presenta valencia +3. Debido al ambiente reductor presente en la célula, el hierro se encuentra casi en su totalidad como hierro +2 y como tal puede formar parte del pool de hierro lábil (LIP, por sus siglas en inglés) o asociarse a proteínas de almacenamiento de hierro, como ferritina. Cuando este se encuentra libre en el citosol puede intercambiarse rápidamente a hierro +3 tras reaccionar, por ejemplo, con compuestos tales como el peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton. Esta actividad oxido-reductora lo convierte en uno de los elementos más reactivos presentes en la célula y, en abundancia, uno de los principales productores de especies reactivas del oxígeno (ROS). Dentro de las ROS se encuentra el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), el que es capaz de generar diversos daños a macromoléculas como proteínas (formando aductos), ácidos nucleicos (generando hidroxil derivados) y lípidos (peroxidación lipídica) (Mackenzie y col., 2008; Britton y col., 1994; Ponka, 1997; Leonarduzzi y col., 1997)

No obstante lo anterior, este importante elemento es esencial para que se lleven a cabo una serie de procesos fisiológicos vitales, tales como la formación de enzimas como la hemoglobina, gracias a la cual se realiza el transporte de oxígeno a través de todos los tejidos del cuerpo; el funcionamiento de enzimas y de vías metabólicas; el funcionamiento apropiado del hígado, entre otras (Mackenzie y col., 2008; González-Chávez y col., 2008; Graham y col., 2007)

## Homeostasis del hierro.

A nivel sistémico, la homeostasis del hierro está regulada principalmente por la absorción de este desde los alimentos en el intestino delgado y por el reciclaje de hierro asociado a hemoglobina en los macrófagos. Es por esto que el enterocito y células mieloides del sistema inmune son los principales modelos de estudio del transporte y homeostasis de este importante metal divalente, modelos que pueden ser extrapolados a la mayoría de los modelos celulares descritos (Trinder y col., 2002; Siah y col., 2006)

El hierro presente en la dieta puede ser encontrado como hierro iónico (o no-hémico) o como hierro hémico, denominado de esta forma por su asociación a grupos hem. El proceso de absorción y posterior traspaso del hierro desde el lumen del enterocito hasta la circulación sanguínea, se encuentra a cargo de un grupo de proteínas que trabajan en conjunto para regular el proceso (Siah y col., 2006). Este sistema es muy eficiente cuando el organismo se encuentra bajo una deficiencia de hierro, pero que es bastante ineficiente cuando se habla de un exceso de este elemento.

En primera instancia, el hierro proveniente de la dieta que se encuentra en el duodeno es reducido desde su forma férrica a su forma ferrosa por la reductasa Dcytb. Esta proteína hémica es una proteína de transmembrana que se encuentra en el borde de las microvelocidades intestinales, lo que le permite entrar en contacto fácilmente con el hierro disponible desde los alimentos (Latunde-Dada y col., 2002). De esta forma el hierro de valencia +2 o hierro ferroso ahora es capaz de atravesar la superficie apical del enterocito a través del transportador de metales divalentes 1, DMT1. Experimentos con animales que poseen mutaciones para el gen *dmt1* muestran que esta proteína es el principal responsable de la incorporación celular de hierro, transformándolo en el

importador de hierro por excelencia (Fleming y col., 1998; Thompson y col., 2006). Cabe destacar que además del hierro proveniente de la dieta existe otra importante entrada de hierro a la célula, a través de la proteína transferrina (Tf). El hierro unido a transferrina es capaz de ingresar a la célula mediante dos receptores presentes en la membrana basolateral del enterocito, TfR1 y TfR2 (Siah y col., 2006).

Una vez que el hierro se encuentra en el lumen del enterocito puede seguir dos rutas, la de almacenamiento o la de ser transportado hacia la circulación sanguínea, proceso que depende de la concentración instantánea de hierro (Hentze y col. 2004)

La vía de almacenamiento de hierro o más bien la captación temporal de este, se encuentra a cargo de ferritina, una proteína de gran tamaño que es capaz de almacenar hasta 4.500 átomos de hierro (Harrison y Arosio, 1996); esta proteína posee dos cadenas proteicas: la cadena H, que posee actividad ferroxidasa y la cadena L, que posee la capacidad de almacenar hierro. A su vez, el hierro que no es almacenado es transportado hacia la circulación a través de la membrana basolateral, por el principal exportador de hierro denominado ferroportina o IREG1. Por último, una vez que el hierro ferroso es transportado hacia el espacio extracelular, es oxidado por la misma ferroportina o en su defecto por la proteína asociada a cobre, hefastina (Aguirre y col., 2005; Donovan y col., 2000; Petrak y Vyoral, 2005).

La regulación de este completo sistema de transporte y almacenamiento de hierro se encuentra a cargo del sistema IRE-IRP. Los elementos IRE son secuencias que se encuentran en el ARN mensajero de una serie de proteínas relacionadas con la homeostasis del hierro. Dependiendo de los niveles de hierro intracelular, a estos elementos se les unen proteínas reguladoras del hierro, o IRP. Esto genera una

regulación post-transcripcional del transcrito con el fin de modular los niveles de la proteína blanco. Cabe destacar que existen dos IRPs, IRP 1 e IRP2 cuya actividad es controlada por los niveles de hierro en la célula. Cuando las IRP son activadas, ya sea por ausencia de hierro, hipoxia o peróxido de hidrógeno estas son capaces de unirse a los elementos IRE. Cuando el elemento IRE se localiza en la región no traducida (UTR) del extremo 5' del ARNm blanco (como en ferritina H, ferritina L e IREG1), las IRP inhiben la formación del complejo de preiniciación de la traducción, bajando de esta forma los niveles de la proteína en cuestión. Si la IRP activada se une a un elemento IRE localizado en el extremo 3' UTR (como en DMT1 y TfR) se genera un aumento de la estabilidad del transcrito, lo que incrementa los niveles de las proteínas señaladas (Klausner y col., 1993; Hentze y Kühn, 1996; Theil, 2004; Mackenzie y col., 2008)

Cuando los niveles de hierro son altos, IRP1 se encuentra desactivada debido a la formación de un cluster hierro-azufre dentro de su estructura, cambiando así su actividad a la de una aconitasa citosólica; e IRP2 es degradada. Esto indica que este sistema es altamente eficiente bajo condiciones de baja concentración de hierro, pero ineficiente bajo altas concentraciones de este elemento. Esto es de suma relevancia ya que altas concentraciones de hierro son sumamente tóxicas para la célula (Kaldy y col., 1999; Mackenzie y col., 2008).

El ejemplo más claro de lo anterior es la hemocromatosis hereditaria (HH), una enfermedad genética en la cual otra proteína reguladora de la homeostasis del hierro, la proteína HFE se encuentra mutada. En la HH se produce una severa acumulación de hierro en los tejidos, cuyo desenlace es un daño crónico en tejidos vitales como el hígado y el corazón. Debido a esto la HH es una enfermedad multisistémica donde se

presentan patologías como la cirrosis hepática, cáncer al hígado, diabetes, insuficiencia cardíaca por cardiopatías, artritis, entre muchas otras (Trinder y col., 2002; Siah y col., 2006).

En la literatura, se han descrito diversas enfermedades neurodegenerativas asociadas a una desregulación de la homeostasis del hierro (Salazar y col., 2006; Logroscino y col., 1997; Smith y col., 1997; Perry y col., 2003). Entre ellas se encuentra la enfermedad de Parkinson (EP), en la cual existe una muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas (tiroxina-hidroxilasa positivas) de la sustancia nigra y una acumulación de hierro en este sector del cerebro medio (Martin y col., 2008; Oakley y col., 2007); o la enfermedad de Alzheimer, donde se genera un cuadro similar de acumulación de hierro en las neuronas del hipocampo y corteza (Smith y col., 1997). Debido al aumento de la incidencia de estas enfermedades, se han puesto en marcha gran cantidad investigaciones que ponen a este reactivo elemento como uno de los principales responsables de la neurodegeneración (Smith y col., 1997; Perry y col., 2003; Salazar y col., 2006).

Por todo lo anterior, parece lógica la existencia de un mecanismo distinto que sea capaz de controlar sobrecargas de hierro a nivel sistémico. Este mecanismo fue descubierto hace solo 8 años (Krause y col., 2000). En su investigación, Krause demostró la existencia del que hasta la fecha se conoce como el regulador maestro de la homeostasis del hierro.

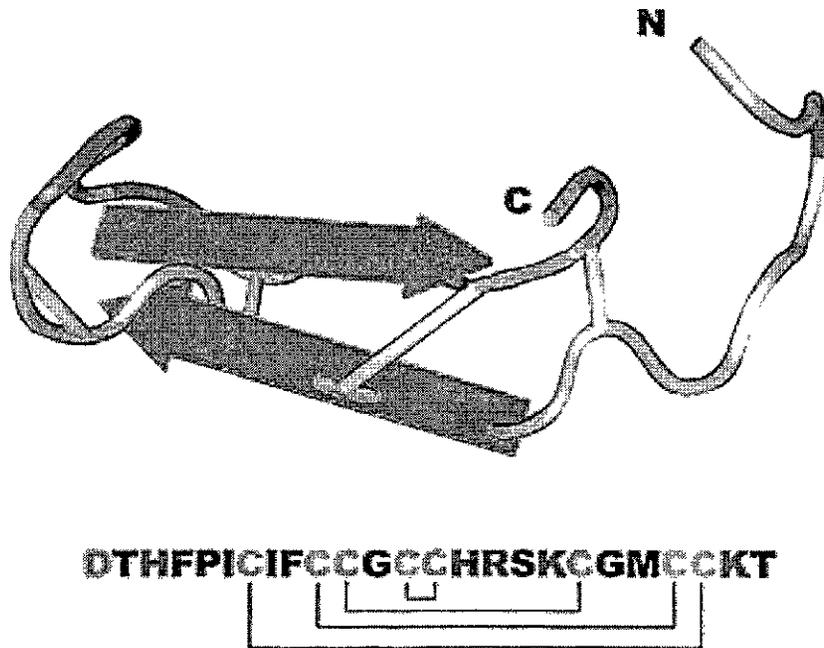
## Hepcidina

Hepcidina es un péptido catiónico cuya forma principal es de 25 aminoácidos (también existen formas de 20 y 22 aminoácidos (Park y col., 2001; Ganz, 2003). Se encuentra muy conservado en los mamíferos y está relacionado con péptidos con actividad microbiciada presente en peces (Lou y col., 2004).

En humanos, hepcidina proviene del extremo carboxilo terminal de un propéptido de 84 aminoácidos codificado por un ARNm de 400pb generado por 3 exones provenientes de un gen de 2,5kb ubicado en el cromosoma 19 (Ganz, 2003). En ratones, el locus de hepcidina es producto de una duplicación génica, donde se generaron dos copias del gen, *hepc1* y *hepc2*, ambas localizadas en el cromosoma 7 con una identidad 93%. A pesar de esta gran identidad, solo *hepc1* tiene un rol importante controlando la homeostasis del hierro (Lou y col., 2004).

En la primera publicación que mencionó a hepcidina se describió a un péptido de 25 aminoácidos, aislado de sangre ultrafiltrada de humano, rico en cisteínas, que poseía 4 puentes disulfuro, expresado mayoritariamente en el hígado y con una actividad microbiciada tanto frente a bacterias gram positivas y gram negativas como frente a levaduras como *Sacharomyces cereviseae*; Krause y sus colaboradores llamaron a este péptido con el nombre de LEAP-1 (Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 1) (Krause, y col., 2000).

Los primeros en llamar a este péptido con el nombre hepcidina fue el grupo de Christina H. Park en marzo de 2001 (hep: hígado; cidina: por sus propiedades microbicidas) quienes lo aislaron desde orina de humano.



*Figura 1. Modelo de la estructura tridimensional de hepcidina de humano. Obtenida de Ganz, 2003*

A nivel de estructura aminoacídica, hepcidina es tan solo un “clip” cuyos brazos están unidos por 4 puentes disulfuro formados por las 8 cisteínas que conforman su estructura (Figura 1). Uno de estos puentes disulfuros está formado por dos cisteínas adyacentes, lo que le confiere actividad anti-microbiana (Ganz, 2003).

A pesar de que la expresión de hepcidina fue relacionada desde un principio con el hígado, se ha documentado que este péptido es expresado por muchos otros tejidos tales como el estómago, intestino, colon, pulmón, corazón, timo, cerebro (tanto en neuronas como en glías), riñón y en células mieloides como macrófagos y neutrófilos. (Krause y col., 2000; Park y col., 2001; Pigeon y col., 2001; Zechel y col., 2006; Peyssonnaud y col., 2006; Nguyen y col., 2006).

El primer fenómeno fisiológico relacionado con la expresión de hepcidina fue la homeostasis del hierro (Pigeon y col., 2001). Por ensayos de northern blot se observó que la cantidad de ARNm de hepcidina aumenta casi 10 veces en ratones sujetos a una sobrecarga de hierro en comparación con un ratón control. Estos resultados fueron similares a los observados al tratar ratones con lipopolisacárido (LPS) provenientes de una cepa de *Escherichia coli*, donde el ARNm de hepcidina aumenta más de 4 veces.

Por otra parte, se ha demostrado que un defecto en la expresión de hepcidina se relaciona directamente con una sobrecarga de hierro multivisceral, en ratones deficientes en el gen que codifica para el factor de transcripción *upstream stimulatory factor 2* (USF2) (Nicolas y col., 2001). Este estudio es aún más relevante ya que en este se postuló por primera vez una relación entre la acción de hepcidina, la acumulación de hierro en macrófagos y la disminución en la absorción de hierro intestinal (Figura 2).

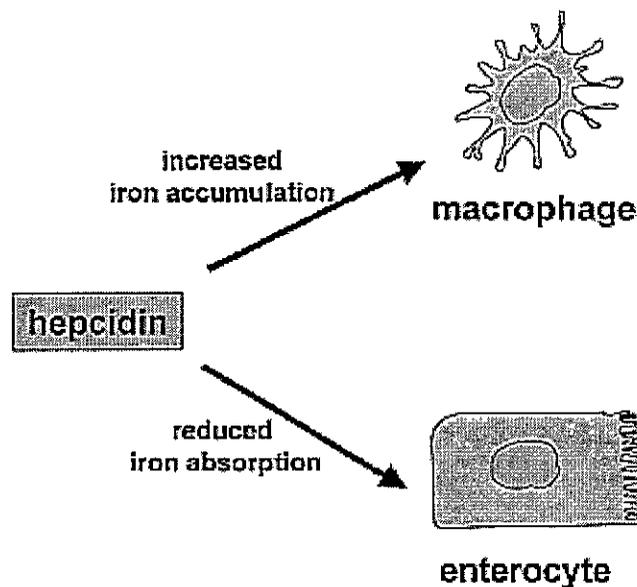


Figura 2. Modelo hipotético para el papel de hepcidina como regulador clave de la homeostasis del hierro. Obtenida de Nicolas y col., 2001.

USF2 es un activador transcripcional muy versátil que activa la expresión de una gran cantidad de genes, destacándose entre ellos algunos relacionados con la regulación del sistema inmune (Corre y Galibert, 2005). Esto es relevante debido a que hepcidina es considerado un gen de respuesta a fase aguda tipo 2 (Nemeth y col., 2003). Asimismo se ha demostrado que una sobreexpresión de hepcidina genera procesos inflamatorios, agudos y crónicos que involucran inmunidad celular, lo que en sistemas *in vivo* desencadena la llamada enfermedad de anemia crónica (ACD) o anemia inflamatoria. En esta enfermedad se generan una acumulación de hierro dentro de los macrófagos, y por ello una disminución del hierro circulante debido a un defectuoso reciclaje de este elemento desde el sistema reticuloendotelial (RES) (Nicolas y col., 2002a; Theurl y col., 2008).

Por otra parte, cabe destacar que USF2 es un factor de transcripción que es activado por kinasas del tipo p38, las cuales son sensibles a estímulos del tipo oxidativo (Galibert y col., 2001) lo que puede correlacionarse con la alta reactividad y facilidad para generar especies reactivas del oxígeno (ROS) que posee el hierro.

### **Hepcidina y la homeostasis del hierro.**

A pesar de que desde un principio se relacionó a hepcidina con la homeostasis del hierro, el mecanismo molecular mediante el cual este péptido catiónico regula la concentración de hierro plasmático no fue dilucidado hasta el año 2004. En este trabajo se demostró que hepcidina se une al único exportador de hierro conocido en vertebrados, ferroportina o IREG1 (Nemeth y col., 2004b); tras esto, IREG1 es internalizado y guiado a una ruta de degradación. Cabe destacar que a pesar de que es una investigación de

suma importancia no se debe olvidar que este estudio se realizó en células de riñón de humano HEK293 y que se ha demostrado que hepcidina tiene un efecto célula-específico (Mena y col., 2008; Chaston y col., 2008).

El mecanismo molecular por el cual hepcidina regula negativamente a IREG1 fue dilucidado el año recién pasado. Aquí se demostró que hepcidina induce la fosforilación, posiblemente por una kinasa del tipo src, de dos tirosinas (302 y 303) que forman parte del dominio extracelular de esta proteína de transmembrana. Este evento de fosforilación es indispensable para la internalización de IREG1, ya que tras la fosforilación de cualquiera de las dos tirosinas ocurre una alteración estructural en la interacción proteína-lípido, favoreciéndose este proceso. Una vez ocurrida la internalización, IREG1 es ubiquitinada y destinada finalmente a la vía de tráfico del cuerpo multivesicular (MVB) para su posterior degradación en endosoma tardío/lisosoma (De Domenico y col., 2007)

### **Regulación de la expresión de hepcidina**

Hasta la fecha los cambios en la expresión de hepcidina han sido relacionados con los siguientes fenómenos: Anemia, hipoxia, inflamación, isquemia, infección, concentración de hierro y de ROS (Nicolas y col., 2002b; Pigeon y col., 2001; Goss y col., 2005, Harrison-Findik y col., 2006; Choi y col., 2007). De estos eventos, se sabe que procesos como inflamación, infección, isquemia y altas concentraciones de hierro aumentan la expresión de hepcidina; mientras que anemia, hipoxia y altas concentraciones de ROS suprimen la expresión de este péptido.

Con respecto a factores de transcripción, se ha reportado que la expresión de hepcidina puede ser modificada por proteínas como la de unión al enhancer CCAAT $\alpha$  (C/EBP $\alpha$  y C/EBP $\beta$ ), cuya expresión es inducida por factores como LPS y citoquinas inflamatorias como las interleukinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6). La función de estos factores de transcripción esta relacionada con la mediación de vías de señalización, uniendo elementos de respuesta a IL-6 a promotores de genes de respuesta a fase aguda, tal como hepcidina (Lekstrom-Hines y Xanthopoulos; 1998; Courselaud y col., 2002). Otro mediador de la expresión de hepcidina es SMAD4, un factor de transcripción involucrado en la vía de señalización de TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ). Cabe destacar que dentro de la familia de TGF- $\beta$  se encuentran las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) (Babitt y col., 2006) cuya deficiencia bloquea completamente la expresión de hepcidina frente a estímulos del tipo IL-6 y sobrecarga de hierro (Wang y col., 2005)). Por último se encuentra STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), un factor de transcripción que activa la expresión de hepcidina luego de ser fosforilado tras la unión de IL-6 con su receptor (Wrighting y Andrews, 2006).

#### *Regulación de la expresión de hepcidina por hierro*

A pesar del importante papel de hepcidina en la homeostasis del hierro, solo hace un año se publicó la existencia de una región de respuesta a hierro en el promotor de hepcidina. Esta región se encuentra entre 1.6 y 1.8kb río arriba del sitio del inicio de la transcripción (Truksa, 2007a). Un aspecto interesante de este hallazgo es que este sitio es la misma región requerida para la respuesta *in vitro* de células HepG2 a estímulos de proteínas BMP, como BMP-4 y BMP-9 (Truksa, 2007b), las que también han sido

relacionados con la expresión de hepcidina como parte de la vía de activación mediante SMAD4 (Babitt y col., 2006).

### *Regulación de la expresión de hepcidina por interleukinas del tipo inflamatorias*

Estudios recientes han demostrado que los fenómenos inflamatorios inducidos por la administración de turpentina, de IL-1 o IL-6, son capaces de aumentar considerablemente la expresión de hepcidina en líneas celulares y en cultivo primario de hepatocitos humanos (Nicolas y col., 2002b; Lee y col., 2005; Nemeth y col., 2004a). Mientras que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), otro partícipe importante de la respuesta inmune, presenta un efecto supresor de la expresión de este péptido (Nemeth y col., 2004a).

Se ha reportado que IL-6 regula directamente la expresión de hepcidina a través de la inducción del transductor de señales y activador transcripcional STAT3 (Wrighting y Andrews, 2006). IL-6 también es capaz de activar a STAT1 pero este factor no es tan relevante como STAT3 el que se une directamente al promotor de hepcidina (Wrighting y Andrews, 2006; Pietrangelo y col., 2007). Cuando IL-6 es secretada, se une al complejo de su receptor y a la proteína gp130. La interacción ligando-receptor de IL-6 resulta en la activación de las kinasas Janus (JAKs) las que fosforilan en último término a STAT3 en la tirosina 705 (Pietrangelo y col., 2007). Tras esto, STAT3 se transloca al núcleo regulando expresión génica. Cabe destacar que debido a que la inducción de hepcidina vía IL-6 no requiere síntesis de proteínas, este es un mecanismo rápido y directo de control de su expresión (Pietrangelo y col., 2007).

### *Regulación de la expresión de hepcidina por LPS*

Desde el descubrimiento de hepcidina el LPS, en conjunto con otros estímulos, ha sido asociado con la regulación de su expresión en células hepáticas (Pigeon y col., 2001). Sin embargo, estudios en macrófagos alveolares demostraron que el único estímulo capaz de regular la expresión de este péptido catiónico es el LPS (Nguyen y col., 2006), demostrando así que la regulación de su expresión en células mieloides es completamente independiente de la expresión hepática de este péptido, sugiriendo la existencia de un mecanismo completamente diferente. En ese mismo año, se demostró que la expresión de hepcidina tanto en macrófagos como en neutrófilos, es dependiente del receptor tipo Toll4 (TLR4) (Peyssonaux y col., 2006); el cual posee en su estructura un sitio de unión a LPS. Cuando esta unión se hace efectiva, se genera una cascada de señales que involucra a una serie de adaptadores que unen a TLR4 con serina-treonina kinasas (Song y col., 2007). Este complejo, media la fosforilación de una serie de sustratos que eventualmente generan la activación de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción que regula la expresión de citoquinas inmunomoduladoras como IL-6, generándose de esta forma, la activación de una respuesta inflamatoria en la célula mieloides (Song y col., 2007).

Últimamente se han hecho una serie de estudios relacionando el LPS y la inflamación en modelos de la EP. En ellos se ha demostrado que, (1) al inyectar LPS intravenosamente, este es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica y generar un aumento del ARNm de hepcidina en sectores como corteza y sustantia nigra (Qin y col., 2008); (2) al inyectar LPS estereotáxicamente dentro de la sustantia nigra, este induce neurodegeneración en las neuronas tirosina-hidroxilasa positivas en forma tiempo y

dosis dependiente (Li y col., 2004; De Pablos y col., 2005); (3) al inyectar LPS en uno de los núcleos basales (el núcleo pálido), la marca tirosina-hidroxilasa en las neuronas de la sustantia nigra disminuye considerablemente, fenómeno acompañado de un incremento de los niveles de hierro y de la expresión de ferritina en las células gliales de la sustantia nigra (Zhang y col., 2005); (4) Al inyectar LPS estereotáxicamente en la sustantia nigra en un modelo de EP en ratones (utilizando 6-OHDA), este potencia la muerte celular de neuronas dopaminérgicas de la sustantia nigra mediante un incremento en los niveles de IL-1 $\beta$ , una activación de células microgliales y expresión de caspasa-11 en el cerebro medio (Arai y col., 2004; Koprach y col., 2008).

Estas evidencias sugieren que existe una estrecha relación entre hepcidina y el sistema inmune en lo que se refiere a inflamación, infección e inmunidad celular. Dentro de esto, los macrófagos tienen un importante papel tanto a nivel de expresión de hepcidina como de control de la homeostasis del hierro por su papel en el reciclaje de hierro desde eritrocitos viejos o dañados (Hentze y col., 2004; Ganz, 2005; Donovan y col., 2006). Asimismo, se ha demostrado que la inflamación crónica está ligada a varias enfermedades neurodegenerativas asociadas a desregulaciones en la homeostasis del hierro, tal como en la EP (Logroscino y col., 1997; Salazar y col., 2006; Hirsch y col., 2005), donde se ha hipotetizado que la relación entre fenómenos inflamatorios y enfermedades neurodegenerativas está mediada por la célula residente del sistema nervioso central que orchestra toda la respuesta inmune del cerebro: la microglia (Block y col., 2007). Las microglías, los macrófagos residentes del sistema nervioso central, frente a diferentes estímulos como traumas, LPS, infección o isquemia pasan a un estado activado en el cual se vuelven tóxicas para las neuronas con las cuales entran en contacto

(Chew y col., 2006; Bédard y col., 2007). Un aspecto muy interesante, es que las microglías activadas liberan citoquinas del tipo inflamatorias como IL-1 e IL-6, las que precisamente activan la expresión de hepcidina (Chew y col., 2006).

Del rol fisiológico que podría tener hepcidina en el cerebro no existe documentación alguna. Es por esto que es interesante describir su efecto sobre un modelo neuronal, tanto a nivel de homeostasis del hierro como a nivel de viabilidad neuronal; además de mostrar que papel juegan las microglías y fenómenos inflamatorios en este proceso. Todo esto con el objetivo de extrapolar a lo que podría estar ocurriendo en enfermedades neurodegenerativas como son la EP y la enfermedad de Alzheimer, las que cada vez toman más relevancia por sus devastadores efectos a nivel neuronal.

## Antecedentes

En nuestro laboratorio se realizó un experimento para observar el efecto que tiene hepcidina en la entrada de hierro en un modelo neuronal. Para esto se observó la incorporación de  $^{55}\text{Fe-NTA}$  en células de neuroblastoma de humano SH-SY5Y, al incubar distintos tiempos con un medio enriquecido en hepcidina (proveniente de células de hepatocito humano HepG2). En este experimento se observó que al incubar 6 horas con hepcidina se observa un aumento de la incorporación del hierro de 2.4 veces, el que se mantiene incluso tras 24 horas de incubación.

Sobre la base de estos resultados y la siguiente evidencia: (1) Presencia de hepcidina en el cerebro tanto en neuronas como en glías (Zechel y col., 2006); (2) Secreción de hepcidina por macrófagos (Nguyen y col., 2006) (que comparte origen común y varias características con las microglías (Bédard y col., 2007)); (3) Aumento en la expresión de hepcidina bajo fenómenos inflamatorios (Nicolas y col., 2002b); (4) Asociación de fenómenos inflamatorios relacionados con activación microglial, con enfermedades neurodegenerativas y desregulaciones de la homeostasis del hierro (Hirsch y col., 2005; Salazar y col., 2006); (5) Muerte neuronal y acumulación de hierro en zonas del cerebro afectadas en enfermedades neurodegenerativas como la EP o tras inyección de LPS (el que a su vez, incrementa la expresión de hepcidina, genera cascadas pro-inflamatorias y genera activación microglial) (Qin y col., 2008; Li y col., 2004; Arai y col., 2004; Koprach y col., 2008; Zhang y col., 2005; Oakley y col., 2007); soportan la hipótesis de que el péptido hepcidina puede generar una desregulación en la homeostasis del hierro en un modelo neuronal, asociada a una disminución de la viabilidad celular.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Aumento de hepcidina altera la expresión de proteínas relacionadas con la homeostasis del hierro en un modelo neuronal, células SH-SY5Y, lo que lleva a una acumulación de hierro intracelular.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el efecto de hepcidina en la expresión de proteínas relacionadas con la homeostasis del hierro en un modelo neuronal.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1. Caracterizar del efecto de hepcidina en la homeostasis del hierro en línea celular de neuroblastoma de humano.**
  - 1.1 Determinar si existe desregulación de la homeostasis de hierro.**
  - 1.2 Evaluar el efecto de hepcidina en la expresión de proteínas involucradas en la homeostasis del hierro.**
- 2. Caracterizar la expresión de ARNm de hepcidina en cultivo primario de astrocitos y microglías corticales**
- 3. Observar el efecto del hierro en cultivo primario de microglías corticales.**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 MATERIALES

#### 2.1.1 Reactivos generales

BCA, Borato de sodio, BSA,  $C_6H_8O_7$ ,  $CaCl_2$ ,  $CH_3-COOH$ , Cloroformo,  $CO_2$ , Dipiridilo, DMSO, EDTA, Etanol, Etanolamina,  $FeCl_3$ ,  $^{55}FeCl_3$ , Glicerol, Glicina, Glucosa,  $H_2SO_4$ , HCl, Hepes, Isopropanol, KCl, Medio LB, Metabisulfito de sodio, Metanol,  $MgCl_2$ ,  $NaHCO_3$ ,  $Na_2CO_3$ , NaCl, NaOH, NTA, Paraformaldehído, Piruvato de Sodio, SDS, Sefarosa-CNBr, SP-Sefarosa, Tris base, Tritón X-100, Tween 20,  $\beta$ -mercaptoetanol,

#### 2.1.2 Cultivo celular.

Antibiótico/Antimicótico (15240-062, Gibco), DMEM (12100-046, Gibco), DMEM:F12 (12400-024, Gibco), DNasa (Sigma), F12 (21700-075, Gibco), G418 (Sigma), HBSS, Lidocaina (Sigma), Lipofectamina 2000 (Invitrogen), LPS desde *Escherichia coli* Serotipo 026:B6 (L8274-25MG, Sigma), MEM (61100-061, Gibco), Neurobasal (21103049, Gibco), OptiMEM (31985, Gibco), PBS (21600-010, Gibco), Poly-L-lisina (p4707, Sigma), Suero Fetal Bovino (EuroClone), Tripsina 10X (15400-054, Gibco).

#### 2.1.3 Biología Molecular.

Acrilamida (Merck); Agarosa (Bioaxis), Ampicilina (Sigma), Azul de bromofenol (Biorad), Bromuro de etidio, Buffer RT Polimerasa (5X First-Strand Buffer) (Invitrogen), Buffer Taq polimerasa 10X (Fermenta), DEPC, dNTP Mix (NEB), DNasa

Lipofectamina (Invitrogen), Marcador de peso molecular ácidos nucleicos, 1 Kb HyperLader (Bioline) y 100 pb (NEB), Marcador de peso molecular proteínas, Precision Plus Protein Dual Color standards (BioRad), metilendiacrilamida (Merck), MgCl<sub>2</sub> (Fermenta), RNasa A (Sigma), TAE, Taq DNA polimerasa (Bioaxis), Transcriptasa Reversa (M-MuLV) (NEB), Trizol (Invitrogen).

#### **2.1.4 Líneas celulares.**

Línea celular HEK 293, proveniente de riñón humano, utilizada como modelo de transfección de alta eficiencia (American Type Culture Collection Number CRL-11268). Línea celular HepG2, derivada de carcinoma de hígado (American Type Culture Collection Number HB8065). Línea celular SH-SY5Y, proveniente de neuroblastoma de humano (American Type Culture Collection Number CRL-2266).

#### **2.1.5 Cultivo primario**

El cultivo primario de microglías y de astrocitos fue realizado a partir de un cultivo primario mixto de glías de corteza de ratas neonatas Spreague-Dowley y posterior separación de los tipos celulares requeridos.

#### **2.1.6 Equipos**

Cámaras de electroforesis para geles de agarosa (Bioschile), Campana de flujo laminar (Nuair), Centrífuga (Beckman) J2-21, Contador de centelleo beta (Cobra II, Packard), Espectrómetro UV-Vis (Perkin Elmer 599), Incubador CO<sub>2</sub>-water Jacketed auto flow (Nuair), Lector de placas (Sunrise Tecan), Lector de placas fluorescentes

CytoFluor II, Microcentrífuga Refrigerada Micro 22R (Hettich), Microscopio Confocal, (Carl Zeiss) LSM 510 meta, Microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss), Minigel (Biorad), Termociclador Minicycler (MJ research).

### **2.1.7 Materiales de cultivo**

Placas de 96 pocillos, 0.3 cm<sup>2</sup> de superficie (Nunc 167008); Placas de 12 pocillos, 4 cm<sup>2</sup> de superficie (Costar 3512); Placas de 6 pocillos, 10 cm<sup>2</sup> superficie (Costar 3506); Placas P35, 35mm de diámetro 10 cm<sup>2</sup> de superficie (Corning 430165); Placas P60, 60mm de diámetro 20 cm<sup>2</sup> de superficie (Corning 430166); Placas P100, 100mm de diámetro 60 cm<sup>2</sup> de superficie (Corning 430167); Botellas plásticas con filtro de 50 mL, superficie 25cm<sup>2</sup> (Nunc 136196); Botellas plásticas de mL, superficie 75cm<sup>2</sup> (Corning 430641); Tubos de centrífuga plásticos 15 y 50 mL (Orange Scientific); Tubos de micro centrífuga plásticos de 1,5 y 0,65mL (Orange estéril) y de 0.2 mL (Sorenson Bioscience); Pipetas plásticas estériles desechables 10mL (TCL); Unidades de filtración desechables Millex-GP 0.22µm (Millipore); Placas Elisa, cultivo celular (Costar 9017); Dispositivos de filtración centrifugables Centricon Plus-20 10KDa (Millipore); Jeringas 5, 10, 20 y 50mL (BD Plastipak) ; Unidades de filtración para bomba de vacío Steritop (Millipore).

### **2.1.8 Anticuerpos**

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: Anticuerpo IgG acoplado a peroxidasa de conejo, dilución 1:10000 (Pierce). Anticuerpo IgG acoplado a peroxidasa

de ratón, dilución 1:5000 (Pierce). Anticuerpo IgG conjugado con Alexa Fluor 488 de ratón, dilución 1:200 (Molecular Probes). Anticuerpo monoclonal anti-actina de ratón, dilución 1:10000 (Sigma). Anticuerpo monoclonal anti-GFAP de conejo, dilución 1:800 (Promega). Isolectina G5-IB4 conjugada con Alexa Fluor 568 de Griffonia simplicifolia, dilución 1:100 (Molecular Probes). Anticuerpo policlonal anti-DMT1 de conejo, dilución 1:2500. Anticuerpo monoclonal anti-IREG1 de ratón, dilución 1:750. Anticuerpo policlonal anti-hepcidina de conejo, dilución 1:1000.

## **2.2 MÉTODOS**

### **2.2.1 Cultivo celular**

La línea celular de hepatocito de humano HepG2 fue cultivada en medio MEM 10% SFB suplementado con piruvato de sodio,  $\text{NaHCO}_3$  y antibiótico para procariontes (fungizona, penicilina, estreptomycin) en un incubador con aire humedecido con 5%  $\text{CO}_2$ , a 37°C. Estas células fueron sembradas en placas P100 con el objetivo de recolectar la mayor cantidad de medio condicionado.

La línea celular de riñón humano HEK293 fue cultivada en medio DMEM 5% SFB, con antibióticos para procariontes en un incubador con aire humedecido 5%  $\text{CO}_2$ , a 37°C. Para generar clones estables pcDNA3.1/Hepcidina-V5-His-TOPO y pcDNA3.1/V5-His-TOPO (como control negativo, ya que el epítipo V5 no se transcribe si no hay un codón de inicio río arriba) fueron utilizadas placas P35. Con el objetivo de recolectar medios condicionados, el cultivo de este tipo celular fue llevado a cabo principalmente en placas P100.

La línea celular SH-SY5Y fue cultivada en medio MEM-F12 10% SFB suplementado con NaHCO<sub>3</sub>, HEPES, aminoácidos no esenciales y antibióticos contra procariontes en un incubador con aire humedecido 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C. El cultivo de este tipo celular fue llevado a cabo tanto en placas como en botellas dependiendo el caso. Para los experimentos de incorporación de <sup>55</sup>Fe-NTA, células SH-SY5Y fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una confluencia del 80% y tratadas durante distintos tiempos y distintas diluciones de medio condicionado enriquecido con hepcidina o con hepcidina parcialmente purificada según el caso. Cumplido este periodo, las células fueron tratadas según el protocolo de incorporación de <sup>55</sup>Fe-NTA.

Para los ensayos de Western blot, las células de neuroblastoma fueron sembradas en placas P60 y tratadas según el caso con distintos medios condicionados. Pasado este tiempo, las células fueron soltadas con Tris salino EDTA, para luego realizar extracción de proteínas.

### **2.2.2 Cultivo primario de corteza de rata**

El cultivo mixto de glías fue preparado desde corteza cerebral de ratas neonatas (de 1-3 días) de la especie Sprague-Dowley (vivero Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile). Luego de extraer el cerebro de los neonatos, fue realizado un corte en 45° desde el centro de los hemisferios con el objetivo de obtener una corteza casi limpia de sustancia blanca. Posteriormente fueron extraídas las meninges y el resto de sustancia blanca presente en la corteza. Una vez limpia, la corteza fue disociada durante 15 minutos de forma química con Tripsina 1X a 37°C (1mL de Tripsina 10X, 9 mL de solución HANK's, 5uL de DNAsa A). Posteriormente fue disociada de forma mecánica,

primero cortando el tejido en pedazos pequeños y luego con pipetas pasteur de diferente diámetro. Una vez terminada la disociación, las células corticales fueron sembradas en medio DMEM-F12 10% SFB en botellas T75 y cultivadas en aire humidificado con 5% CO<sub>2</sub>/ 95% aire a 37°C. El medio fue reemplazado en un 100% al día siguiente (20-24 horas después del cultivo) y luego en un 50% cada 5-7 días hasta llegar a 20-25 DIV en el caso de cultivo de microglías y hasta 7-10 DIV en el caso de cultivo de astrocitos.

El cultivo de microglías fue preparado de la siguiente forma: el medio de cultivo presente en la botella fue extraído y centrifugado durante 8 minutos a 2000 rpm, al mismo tiempo que las células adheridas a la botella, fueron tratadas con una solución de lidocaina 12 mM en DMEM-F12 10%SFB, durante 8-10 minutos con agitación manual suave. Una vez terminada la centrifugación del medio, fue recuperado el sobrenadante (que posteriormente fue utilizado como medio condicionado) y el pellet (que contiene células microgliales). Por su parte, tras el periodo de incubación señalado, la solución de lidocaina fue extraída de la botella y centrifugada junto al pellet anterior durante 8 minutos a 2000rpm. Esta vez fue descartado el sobrenadante y este nuevo pellet fue resuspendido rápidamente en 3 mL del medio condicionado guardado en el paso anterior. Finalmente, se procedió a contar densidad celular con una cámara de Neubauer, para luego sembrar las células resultantes en placas de 6 pocillos (250.000 células por pocillo) para ensayos de RT-PCR y en covers de 12mm de diámetro (50.000 células por cover) para ensayos de inmunocitoquímica y ensayos de determinación de nitritos. Es importante recalcar que todo este procedimiento se debe llevar a cabo rápidamente debido a que las microglías presentan gran adhesión por cualquier material plástico.

El cultivo primario de astrocitos se obtuvo de la siguiente forma: el cultivo adherido a las botellas fue incubado con tripsina 1X durante 5 minutos a 37°C, tras lo cual se agregó DMEM-F12 10% SFB con el objetivo de neutralizar la tripsina. La suspensión resultante fue centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos y recuperado el pellet celular. El pellet fue resuspendido en una solución de DMEM-F12 10% SFB 5% DMSO. La suspensión celular fue colocada en un tubo de criopreservación y congelado a -80°C durante 1 día, tras lo cual fue guardado en nitrógeno líquido hasta ser necesitado. Todo esto se realizó con el objetivo de eliminar microglías y/o oligodendrocitos que puedan encontrarse en el cultivo mixto de glías. Una vez descongelado el cultivo fueron sembradas placas P35 para ensayos de RT-PCR y covers de 12mm de diámetro para ensayos de inmunocitoquímica.

### **2.2.3 Obtención de ARNm y ADNc**

Se obtuvo ARNm desde células HEK293, SH-SY5Y y cultivo primario de microglías y de astrocitos de la siguiente forma. Células sembradas en placas de 6 pocillos, previamente lavadas con PBS, fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente, bajo campana, con 1mL de Trizol. Pasado este tiempo, la solución que ahora contiene complejos núcleo-proteínas disociados fue recuperada mediante pipeteo y colocada en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL. En el mesón, se agregó a cada tubo 200µL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Posteriormente se dejó la solución a temperatura ambiente 2-3 minutos y se centrifugó durante 15 minutos a 11.000 rpm a 4°C. La fase acuosa resultante fue traspasada a un tubo limpio de microcentrífuga, al que se agregó 500 µL de isopropanol

con objetivo de precipitar los ácidos nucleicos presentes. Se agitó suavemente y dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos para posteriormente centrifugar durante 10 minutos a 11.000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet resultante lavado con 400 µL de una solución 75% etanol en agua DEPC autoclavada. La suspensión fue centrifugada nuevamente, esta vez durante 5 minutos a 8500 rpm. El pellet resultante fue resuspendido en 40 µL de agua DEPC y guardado a -20°C. Es importante recalcar que el pellet de ARN no se debe dejar seco.

El ADNc se obtuvo a partir del ARN extraído en el paso anterior mediante la técnica de transcripción reversa de la siguiente forma. En un tubo de PCR (200 µL) se agregó 2µL de ARN, 0.5µg del partidor Oligo dT y Agua DEPC, y se incubó 5 minutos a 70°C y 2 minutos a 4°C. Tras este periodo, al mismo tubo se le agregó 6 µL de una mezcla de Tampón de PCR 10X, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs 10mM, DTT 0.1M e inhibidor de ribonucleasas, solución que fue incubada a 42°C por 5 minutos. Luego se agregó 1µL de Transcriptasa Reversa y se incubó por 50 minutos nuevamente a 42°C. Posteriormente la temperatura se aumentó a 70°C por 15 minutos, y luego 20 minutos a 37°C, para terminar el proceso incubando a 4°C. El producto (ADNc) se guarda a -20°C.

#### **2.2.4 Obtención de extracto de Proteínas**

Una vez que las células destinadas a extracto de proteínas son soltadas con tris salino EDTA, estas fueron transferidas a un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL y centrifugadas durante 5 minutos a 2500rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó 400µL de PBS con el objetivo de lavar el pellet celular. La solución fue

centrifugada nuevamente durante 5 minutos a la misma velocidad y nuevamente fue descartado el sobrenadante. Al pellet resultante se le agregó un volumen apropiado de una solución que contiene Buffer de Lisis con inhibidor de proteasas en una relación (100:1); la mezcla resultante fue resuspendida vigorosamente ya sea por pipeteo o por vortex y fue incubada en hielo durante un mínimo de 15 minutos. Por último se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm y se recuperó el sobrenadante, el cual contiene las proteínas disueltas.

#### **2.2.5 Determinación de la concentración de proteínas.**

La determinación de la concentración de proteínas fue realizada mediante la técnica de BCA. Esta técnica consiste en tomar un volumen apropiado de cada muestra de extracto de proteínas tal que sumado a un volumen de agua den un total de 20 $\mu$ L. A este volumen se le agregó 180 $\mu$ L de una solución de BCA y CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (4%) los cuales se encuentran en una relación de 50:1. Luego de homogeneizar las soluciones fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C. Pasado este lapso de tiempo, se midió la absorbancia de las soluciones a 562nm. Para establecer la concentración de proteínas se realizó, además, el mismo procedimiento con una curva de calibración realizada con un stock de proteína BSA, todo en triplicado.

### **2.2.6 Obtención de medio condicionado enriquecido con hepcidina desde línea celular de hepatocito humano (HepG2)**

Células de la línea celular hepatocito humano HepG2 fueron sembradas en placas P100 a una confluencia de 80%. Una vez cumplida esta condición las células fueron tratadas con 40 $\mu$ M de Fe-NTA en OptiMEM durante 36 horas. Pasado este período el medio fue recolectado y tratado como sigue. Se eliminó el hierro agregado previamente, incubando durante 12-16 horas con agitación con Chelex-100 hasta llegar a una concentración de 3  $\mu$ M. Por último el medio fue filtrado con un filtro Millipore para péptidos de más de 10kDa y con una unidad de filtración de diámetro 0,2  $\mu$ m con el objetivo de eliminar las posibles bacterias presentes en el medio.

### **2.2.7 Transfección de línea celular de riñón humano (HEK 293) con Lipofectamina 2000.**

Debido a problemas experimentales relacionados con el manejo de las células HepG2 y la obtención de los medios condicionados mencionados anteriormente se recurrió a la utilización de dos constructos generados anteriormente en nuestro laboratorio, pcDNA3.1/Hepcidina-V5-His-TOPO (denominado como Hepc) y pcDNA3.1/V5-His-TOPO (denominado como TOPO) los cuales fueron transfectados en células de línea HEK 293, por la alta eficiencia de transfección que posee este tipo celular. Cabe destacar que el gen de hepcidina es de origen humano y fue clonado dentro de los vectores con los partidores HepForward1 (CAG ACG GCA CGA TGG CAC TGA GC) y HepRev1 (TAG GTT CAA CGT CTT GCA GCA). Un esquema del vector pcDNA3.1/Hepcidina-V5-His-TOPO se encuentra detallado en la Figura 5.

Las células fueron sembradas un día antes de la transfección con un 40% de confluencia (debido al corto tiempo generacional de este tipo celular) en placas P35 en medio DMEM 10% FBS sin antibiótico. Pasadas las 24 horas, y sin cambiar el medio de cultivo, se le agregó 500  $\mu$ L de una solución que contiene ADN asociado a Lipofectamina 2000 en OptiMEM. Se incubó durante 4-6 horas a 37°C, tras lo cual fue necesario cambiar el medio de cultivo para no afectar la viabilidad celular. Posteriormente, se incubó durante 42-44 horas con medio DMEM 10% FBS con antibiótico, y luego se cambió a un medio de selección 800ug/mL de gentamicina (G418). Las células fueron incubadas con este medio de selección durante 15 días hasta obtener células transfectadas establemente. Tras este período de tiempo, se seleccionaron clones estables por su capacidad de expresar el ARNm de hepcidina.

### **2.2.8 Obtención de medio condicionado enriquecido con hepcidina recombinante**

Células de la línea celular HEK293 transfectadas establemente con los vectores Hepc y TOPO (HEK Hepc y HEK TOPO respectivamente) fueron sembradas en placas P100 a una confluencia de 30%. Estas células fueron seleccionadas con medio DMEM 5% FBS con 400 ug/mL de G418 hasta que llegan a un 80% de confluencia, en este momento las células fueron crecidas en medio DMEM sin suero y sin G418 durante 24 horas, tras este lapso de tiempo el medio fue recolectado y reemplazado por uno de iguales condiciones. Este proceso solo se realizó durante 2 días, tras los cuales las células fueron tripsinizadas y sembradas como se detalló en un principio. El medio

recolectado fue filtrado con una unidad de filtración de diámetro 0,2  $\mu\text{m}$  y congelado a -20°C hasta su utilización.

### **2.2.9 Purificación parcial de hepcidina recombinante**

La purificación de este péptido catiónico se llevó a cabo con una columna de intercambio catiónico (CIC) utilizando un protocolo modificado de Wallace y col., (2006). El medio extraído fue mezclado en partes iguales con un buffer 30mM acetato de sodio y 25mM EDTA, pH 6, y aplicado a una columna de 10mL de SP-Sepharosa. Posteriormente la columna fue lavada con una solución 20mM acetato de sodio y 40mM cloruro de sodio, pH 6, hasta que la absorbancia a 280nm del eluido fue inferior a 0,001 unidades. A continuación el péptido fue eluido en un buffer 20mM HEPES, 50mM fosfato dihidrógeno de sodio y 100mM cloruro de sodio, pH 9. Se recolectaron 2 fracciones de 5 mL cada una y luego 3 fracciones de 6 mL. La presencia del péptido fue identificada mediante ensayo antimicrobiano.

### **2.2.10 Ensayo de actividad antimicrobiana**

A una placa P100 para cultivo de bacterias se agregaron 20mL de LB-Agar 2% con Ampicilina 50ug/mL. Una vez gelificada esta capa se agregó 4mL de LB-Agar 2% sin ampicilina con 100uL de un cultivo de noche de *E.coli* resistentes a ampicilina. Cuando la segunda placa se encontró fría, usando una planilla, fue agregado un volumen final de 5uL de las distintas soluciones en cuestión. Se dejó incubar toda la noche a 37°C. Al siguiente día, fue medido el diámetro del halo de inhibición según corresponda.

### **2.2.11 Ensayo de actividad específica de hepcidina parcialmente purificada**

Para verificar que el efecto antimicrobiano de hepcidina purificada es específico de este péptido, se realizó la unión del anticuerpo anti-hepcidina a sefarosa activada con bromuro de cianógeno. Este complejo anticuerpo-sefarosa es incubado con una de las fracciones que presentan actividad antimicrobiana con el objetivo de mostrar que una vez hecho este procedimiento la actividad microbicida disminuye o desaparece.

Inicialmente se realizó la unión del anticuerpo anti-hepcidina purificado con sefarosa activada con bromuro de cianógeno. Este protocolo se llevó a cabo diluyendo el anticuerpo en tampón de unión (0,5M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5M NaCl) e incubando el volumen resultante con 1g de sefarosa durante toda la noche a 4°C. Finalizado este procedimiento se centrifugó a 2000rpm por 1 minuto y se recuperó el precipitado, el que fue lavado 2 veces con tampón de acoplamiento. Los grupos reactivos remanentes fueron bloqueados con etanolamina 1M. Posteriormente, el anticuerpo no unido fue lavado con 3 ciclos de: 0,1M acetato de sodio, 1M NaCl pH 4 y 0.1M borato de sodio, 1M NaCl pH 8. Para finalizar, se lava dos veces con PBS.

Finalmente, el anticuerpo unido a sefarosa fue incubado con un volumen apropiado de una de las fracciones eluidas de la CIC que presentó más actividad, durante toda la noche a 4°C. Tras este lapso de tiempo, se centrifugó a 2000 rpm por 1 minuto y se recuperó el sobrenadante; al que se le verificó su actividad antimicrobiana.

### **2.2.12 Medición de la incorporación de hierro utilizando el isótopo <sup>55</sup>Fe**

Células SH-SY5Y fueron sembradas en placas de 12 pocillos hasta llegar a un 80% de confluencia. Una vez cumplido este requisito fueron incubadas con medio

condicionado enriquecido con hepcidina o con hepcidina purificada según el caso. Una vez pasado el tiempo de incubación, las células fueron tratadas durante 1 hora a 37°C con una solución de MEM-F12 sin suero que contiene una concentración final de 1  $\mu$ M de  $^{55}\text{Fe}$ -NTA. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS frío, con el objetivo de detener tanto la salida como la entrada de hierro radiactivo y para remover todo el hierro radiactivo del medio extracelular. Finalmente las células fueron incubadas con Tris salino EDTA con el objetivo de recuperar todas las células sembradas en los pocillos. Luego de homogeneizar la solución celular, se extrajeron 100  $\mu$ L para determinar radiactividad en un contador de centelleo. Los 900  $\mu$ L restantes se utilizaron para realizar extracción de proteínas y determinación de las mismas, mediante la técnica de BCA. Esto con el objetivo de normalizar las cuentas de radiactividad obtenidas en el paso anterior.

### **2.2.13 Medición de la salida de hierro utilizando el isótopo $^{55}\text{Fe}$**

Células SH-SY5Y son sembradas en placas de 12 pocillos hasta llegar a un 80% de confluencia. Una vez cumplido este requisito fueron incubadas con medio condicionado de células HepG2 enriquecido en hepcidina durante 6 horas. Una vez pasado este tiempo, las células se incubaron durante 30 minutos a 37°C con una solución de MEM-F12 5  $\mu$ M de  $^{55}\text{Fe}$ -NTA. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS frío con el objetivo de detener tanto la salida como la entrada de hierro radiactivo y para remover todo el hierro radiactivo del medio extracelular. Luego se incubó con MEM-F12 sin suero, 200  $\mu$ M DTPA y se extrajeron alícuotas de 100  $\mu$ L cada 0, 10, 20,

30, 40 y 60 minutos, restituyendo en cada caso los 100  $\mu$ L extraídos con medio fresco y realizando las correcciones pertinentes. Los 100  $\mu$ L extraídos se utilizan para determinar radiactividad en un contador de centelleo. Una vez terminado los 60 minutos, las células son tratadas con Tris salino EDTA para soltar las células, con el objetivo de extraer las proteínas totales y determinar la concentración de estas mediante la técnica de BCA. Esto con el objetivo de normalizar las cuentas de radiactividad obtenidas en el paso anterior.

#### **2.2.14 Ensayo de RT-PCR semicuantitativo**

Las células HEK293 transfectadas establemente con los vectores pcDNA3.1 Hepc/V5-His-TOPO (HEK Hepc) y pcDNA3.1/V5-His-TOPO (HEK Topo), fueron sembradas en placas p35 con una confluencia del 30%. Al día siguiente fueron tratadas con 400  $\mu$ g/mL de G418 con el objetivo de seleccionar las células que poseen los plasmidios. Las células fueron cultivadas bajo estas condiciones hasta llegar a un 90-95% de confluencia, tras lo cual se extrajo ARNm tal como se mencionó anteriormente. A partir del ARNm se obtuvo ADNc por la técnica de RT también mencionada anteriormente. Con el ADNc como blanco se realizó un PCR con el objetivo de verificar si las células realmente incorporaron dentro de su ADN genómico los plasmidios mencionados; para realizar esto se utilizó el partidor universal T7, TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG, como partidor forward, y el partidor denominado HepRev1, TAG GTT CAA CGT CTT GCA GCA, partidor reverse con el cuál se clonó el gen de hepcidina dentro del vector mencionado; y que da como resultado un amplificado de 276pb. Las

condiciones del PCR fueron las siguientes: Inicialmente el ADNc fue denaturado a la temperatura de 94°C durante 5 minutos para luego completar 39 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 61°C, y 1 minuto 30 segundos a 72°C; para concluir con una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Como control se amplificó el gen que codifica para la proteína de citoesqueleto actina, para lo cual se utilizó como partidor forward la secuencia CCA CAC CCG CCG CCA GCT C y como partidor reverse ATA GCA CAG CCT GGA TAG CAA CGT ACA, los cuales dan como resultado un amplificado de aproximadamente 500pb; bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. El resultado de la amplificación fue cargado en un gel de agarosa al 2,5% con bromuro de etidio 0.5 ug/mL durante 2 horas a 60V.

Células SH-SY5Y fueron cultivadas en placas P35 hasta llegar a un 80% de confluencia, tras lo cual fueron tratadas con medio condicionado enriquecido con hepcidina o con hepcidina parcialmente purificada según el caso. Cumplido este periodo se extrajo ARNm y se obtuvo ADNc tal como se mencionó anteriormente. Con el ADNc como blanco se realizó un PCR con el objetivo de observar la expresión de los genes que expresan las dos isoformas de la proteína DMT1, +IRE y -IRE. Para esto se utilizaron los siguientes partidores: +IRE, forward TGG GCA TAC GGT AAG CAT CTC T, reverse TCC CAC CCT AAT CCA GTT CTA AG; -IRE, forward TCT GAA CAC CAT GGA CGC TGA CT, reverse CCAT CAG AGG CCA ATC GTT TAA CT. Las condiciones de PCR fueron iguales para ambos genes y son las siguientes: Inicialmente el ADNc fue denaturado a la temperatura de 94°C durante 5 minutos para luego completar 42 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 1 minuto y 30 segundos a 48°C, y 1 minuto a 72°C; para concluir con una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Como control se

amplifico el gen que codifica para la proteína de citoesqueleto actina, bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. El resultado de la amplificación fue cargado en un gel de agarosa al 2,5% con bromuro de etidio 0,5 ug/ml durante 2 horas a 60V. Cabe destacar que para verificar que el RT-PCR fuera semicuantitativo se realizaron curvas de densidad de banda versus número de ciclos, para encontrar un número de ciclos en el cual la actividad de la enzima Taq Polimerasa es lineal.

Células de cultivo primario de microglías y astrocitos, fueron sembradas y cultivadas en 1 placa de 6 pocillos durante 12 horas luego de la separación del cultivo mixto de glías, para luego ser tratadas de la siguiente forma: 2 pocillos fueron tratados con LPS (1ug/mL) con el objetivo de desencadenar la activación de las microglías; 2 pocillos fueron tratados con Fe-NTA 20 y 30uM respectivamente, con el objetivo de observar el efecto de altas concentraciones de hierro en la expresión de hepcidina en las microglías; y por ultimo 2 pocillos fueron utilizados como control. Tras el periodo de tratamiento se extrajo RNA y se obtuvo ADNc tal como se mencionó anteriormente. Con el ADNc como blanco se realizó un PCR con el objetivo de observar la expresión de hepcidina en estas células neuronales. Para realizar esto se utilizaron los siguientes partidores: Heprata-forward GGC AAC AGA CGA GAC AGA CT; Heprata-reverse AGG CTC TTG GCT CTC TAT GT, Las condiciones del PCR fueron las siguientes: Inicialmente el ADNc fue denaturado a la temperatura de 94°C durante 4 minutos para luego completar 35 ciclos de: 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 58°C, y 40 segundos a 72°C; para concluir con una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Como control se utilizaron los mismos partidores de actina mencionados anteriormente, bajo las mismas

condiciones recién descritas. El resultado de la amplificación fue cargado en un gel de agarosa al 2,5% con bromuro de etidio 0.5 ug/mL durante 2 horas a 60V.

### **2.2.15 Ensayo de Inmunodetección por Western blotting y ELISA**

Para observar la expresión de las proteínas DMT1 e IREG1 en las células SH-SY5Y controles y en células tratadas con hepcidina, estas células fueron sembradas en placas P60 a una confluencia del 80% y tratadas con medios enriquecidos en hepcidina durante toda la noche a 37°C. Tras lo cual se procedió a extraer proteínas totales tal como se mencionó anteriormente. Luego de cuantificar la concentración de proteínas extraídas mediante el procedimiento de BCA, se cargaron 30 ug de proteína en un gel SDS Page al 10%. El gel se corrió a 80 volts durante 1 hora y a 110 volts durante aproximadamente 2 horas. Luego las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 2 horas a 300mA a 4°C. Luego se procedió a bloquear la membrana con solución de leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 0.05% con agitación lenta constante. Posteriormente se incubó durante toda la noche con una solución de leche descremada al 0.3% en TBS-Tween20 0.05% con el anticuerpo respectivo a 4°C con agitación constante. Al día siguiente, la membrana fue lavada 3 veces 7 minutos con una solución TBS-Tween20 0.05%. Terminados estos ciclos, se incubó con el anticuerpo secundario IgG acoplado a peroxidasa respectivo, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación lenta constante. Finalmente, la membrana fue lavada de la forma antes mencionada. La señal fue detectada con un kit quimioluminiscente y autoradiografía. En todos los casos, se reutilizaron las membranas de nitrocelulosa, con el objetivo de identificar más de una proteína en las muestras. Este

procedimiento se llevó a cabo con 2 lavados de 30 minutos con una solución de citrato de Sodio 200mM pH 3 y 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween 20 0.05 %, para luego realizar el mismo procedimiento descrito anteriormente a partir del bloqueo de la membrana con leche descremada y posterior incubación con el anticuerpo primario, pero esta vez utilizando un anticuerpo diferente.

Con el objetivo de identificar la presencia del péptido hepcidina en los medios condicionados se realizó el ensayo de ELISA. La razón por la cual no se realizó el ensayo de western blotting en este caso, fue debido a la gran dificultad existente en identificar este péptido utilizando este tipo de técnica tanto por su pequeño tamaño, por sus características fisicoquímicas, como por la calidad del anticuerpo utilizado, el que no funcionó en este tipo de técnica de inmunodetección.

El ensayo de ELISA se realizó utilizando fracciones eluidas de la columna de intercambio catiónico de la siguiente forma: se tomó un volumen adecuado de cada fracción tal que sumado con un volumen de tampón de unión ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.015M;  $\text{NaHCO}_3$  0.036M) sumen 100uL. Este volumen se incubó en una placa de 96 pocillos especial para este tipo de procedimientos, ON a 4°C. Finalizado este período se lavó 3 veces por 5 minutos con 200uL por pocillo con PBS-0.02% Tween 20 pH 7.2. Posteriormente se bloqueó con 200uL por pocillo con PBS-BSA 1% durante 4 horas a temperatura ambiente y se lavó de la misma forma mencionada anteriormente. Luego la placa fue incubada ON a 4°C con 100 uL por pocillo, de suero inmune de conejo anti-hepcidina sintética diluido en PBS-BSA 1% a una concentración de 1:1000. Al término de este período, nuevamente se realizaron lavados como los mencionados y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, con 100uL por pocillo de anticuerpo secundario

Ig-G de conejo asociado a peroxidasa diluido en PBS-BSA 1% a una concentración de 1:20.000. Luego se realizó otro lavado como el anterior y se agregó 100uL por pocillo de tampón sustrato (OPD 0.2%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.02% en 10mL de tampón fosfato cítrico pH 5 (Ácido cítrico 24mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 51mM)) durante 30 minutos a 37°C o hasta que se presente coloración en los pocillos. Por último, para detener la reacción se agregan 50uL por pocillo de ácido sulfúrico 25%, y se lee la absorbancia de la placa a 492nm en la próxima media hora. Todos los valores obtenidos, hechos en triplicados, fueron normalizados con un blanco.

#### **2.2.16 Ensayos de Inmunocitoquímica**

Células microgliales fueron sembradas en covers de 12mm de diámetro. Primero las células fueron lavadas cuidadosamente con PBS, y fijadas con una solución 4% de paraformaldehído 4% sacarosa diluida en PBS, por 10 minutos a 37°C. Posteriormente fueron lavadas 3 veces con PBS durante 5 minutos cada vez. Luego las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 0,2% diluido en PBS a 37°C por 5 minutos y lavadas como se mencionó anteriormente. Cumplidos los pasos anteriores se incubó con una solución de bloqueo (BSA 5% en PBS) por 1 hora a temperatura ambiente, para luego incubar con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en cámara húmeda (cabe destacar que en el caso de la isolectina G5-IB4 esta fue tratada como anticuerpo secundario ya que se encuentra conjugada a Alexa Fluor 568). Nuevamente se lavó 3 veces con PBS. Posteriormente, protegido de la luz, se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Nuevamente se lavó 3 veces con PBS

y 1 vez con agua para finalmente montar los covers en un portaobjetos mediante medio de montaje.

#### **2.2.17 Análisis de imágenes mediante microscopia confocal**

Todas las inmunofluorescencias obtenidas fueron realizadas en un microscopio confocal LSM meta 510 (Carl Zeiss) con un lente Plan-Apochromat 63X/1.4. Las imágenes digitales fueron importadas al programa LSM 5 Image Browser como fotografías individuales. Las mediciones de perímetro y área celular fueron hechas con herramientas del programa LSM 5 Image Browser.

#### **2.2.18 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Tukey con el programa GraphPad InStat 3.06, 32 bit para Windows (GraphPad Software). Los valores se expresan como el promedio de las mediciones  $\pm$  SEM; n=3 determinaciones independientes en triplicado. Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*).

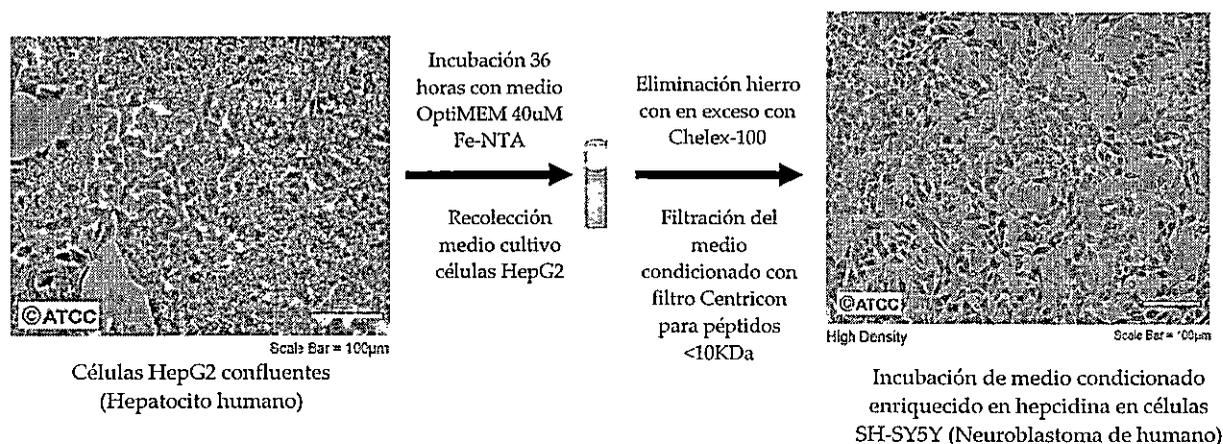
## RESULTADOS

### 3.1 Obtención de medio condicionado enriquecido en hepcidina

#### 3.1.1. Medio condicionado de células HepG2

Hepcidina es secretado principalmente en el hígado, es por ello que inicialmente se utilizaron las células HepG2 como productoras de este péptido catiónico. El procedimiento se encuentra esquematizado en la figura 3.

Como resultado de este procedimiento se obtuvo medio condicionado OptiMEM enriquecido en hepcidina, el que fue posteriormente utilizado en el tratamiento de células SH-SY5Y. Para comprobar la actividad del medio se realizaron ensayos de incorporación de hierro marcado en células Caco-2 (Mena y col., 2008).

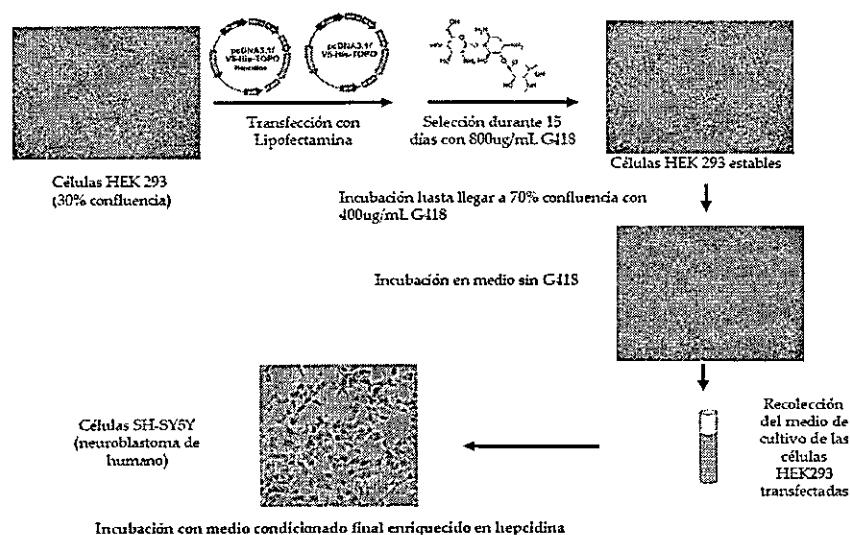


**Figura 3. Obtención de medio condicionado enriquecido en hepcidina desde células HepG2.** Esquema del procedimiento seguido para la obtención de medio enriquecido en hepcidina desde células HepG2. El procedimiento incluyó sembrar células HepG2 y tratarlas durante 36 horas con hierro 40µM, tras este período el medio es recolectado. Luego el medio es tratado con un quelante de metales hasta una concentración de hierro de 7µM y filtrado para eliminar todos los péptidos de más de 10KDa. Por último células SH-SY5Y son tratadas con distintas diluciones de este medio. Las fotografías fueron obtenidas desde la página web de American Type Culture Collection.

### 3.1.2 Medio condicionado de células HEK 293 enriquecidos en hepcidina recombinante

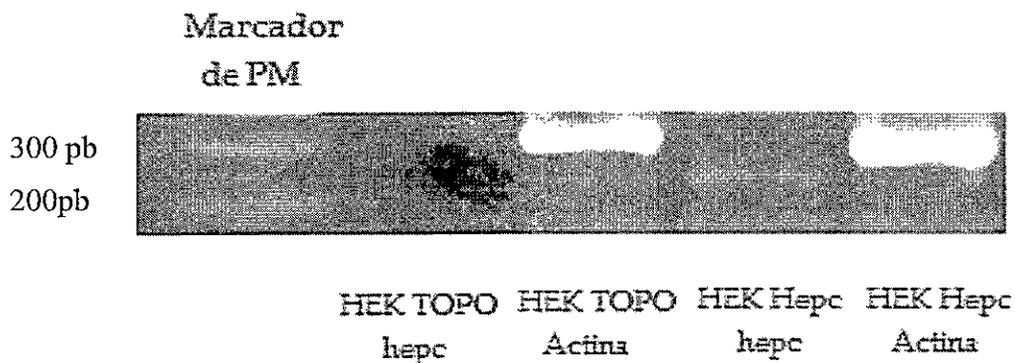
Debido a problemas experimentales, se procedió a utilizar clones estables de células HEK293 transfectadas con los vectores pcDNA3.1/Hepcidina-V5-His-TOPO (HEK Hepc) para la producción de hepcidina recombinante y con el vector vacío pcDNA3.1/V5-His-TOPO (HEK TOPO), como control negativo. El procedimiento de obtención del medio condicionado se encuentra esquematizado en la figura 4.

Como resultado de este procedimiento se obtuvieron medios enriquecidos en hepcidina. Para comprobar la actividad del medio se realizaron experimentos de incorporación de hierro marcado en células Caco-2 (Mena y col., 2008) y ensayos microbicidas preliminares en cultivos bacterianos de *E.coli*.



**Figura 4. Obtención de medio condicionado enriquecido en hepcidina desde células HEK Hepc y HEK TOPO.** Esquema del procedimiento seguido para la obtención de medio enriquecido en hepcidina desde células HEK TOPO y HEK Hepc. El procedimiento incluyó sembrar células HEK Hepc y HEK Topo y cultivarlas durante 48 horas con medio sin suero y sin G418, tras este periodo el medio es recolectado. Luego, el medio es concentrado para eliminar todos los péptidos de más de 10KDa y de menos de 10KDa. Por último células SH-SY5Y son tratadas con distintas diluciones de este medio. Las fotografías fueron obtenidas desde la página web de American Type Culture Collection.



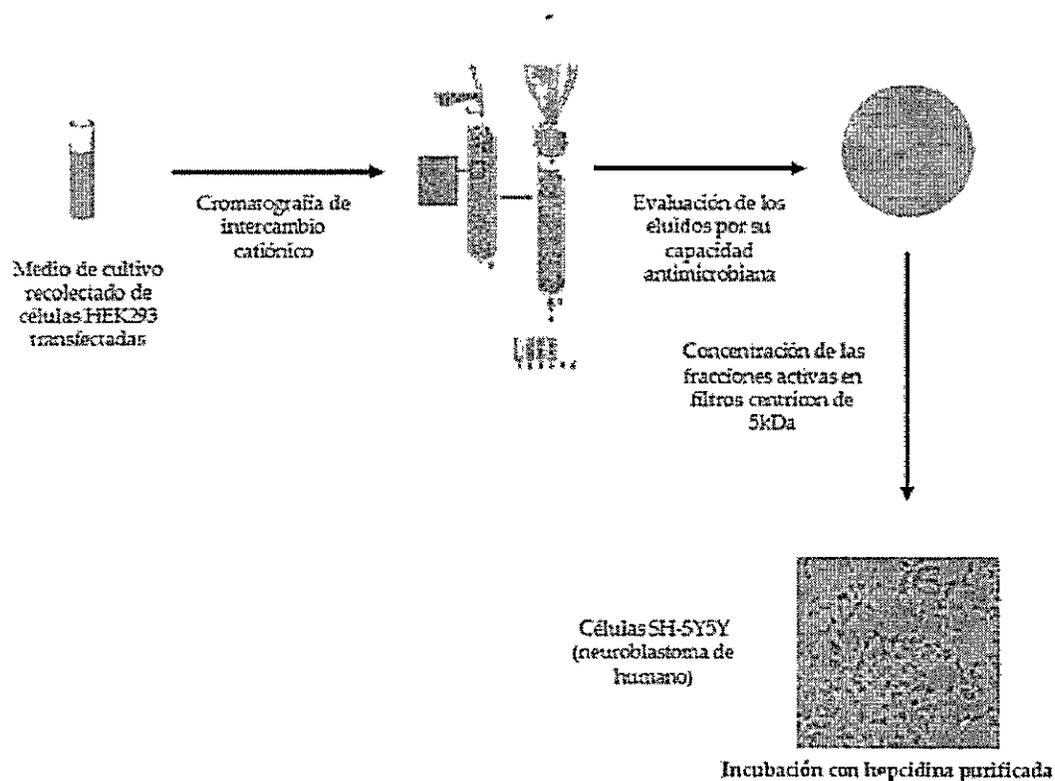


*Figura 6. Expresión de ARNm de hepcidina en células HEK293 transfectadas con los vectores pcDNA3.1/Hepcidina-V5-His-TOPO, evidenciados por RT-PCR semicuantitativo. En la figura se muestra un gel de agarosa con los productos de PCR de ADNc obtenido desde células HEK293 transfectadas con los constructos denominados TOPO y Hepc. En el primer carril se encuentra el estándar de peso molecular, en el segundo carril se encuentra el producto de PCR de células HEK TOPO amplificado para hepcidina, en el tercer carril se encuentra el producto de PCR de células TOPO amplificado para actina, en el cuarto carril se encuentra el producto de PCR de células HEK Hepc amplificado para hepcidina (banda de 267pb correspondiente a hepcidina), en el quinto carril se encuentra el producto de PCR de células HEK Hepc amplificado para actina.*

### **3.2 Purificación parcial de hepcidina recombinante.**

#### **3.2.1 Purificación en columna de intercambio catiónico**

Con el objetivo de utilizar una hepcidina más pura que la obtenida en los medios condicionados se aprovechó la característica catiónica de este péptido y se realizó una purificación mediante una columna de intercambio catiónico (CIC) usando como resina SP-Sefarosa. El procedimiento se encuentra esquematizado a continuación. Cabe destacar que a pesar de que la cola de histidina que posee hepcidina recombinante podría facilitar en gran medida su purificación al utilizar columnas de nickel, estas no fueron utilizadas debido a que luego de este protocolo se deben dializar los eluidos y debido al pequeño tamaño de hepcidina esto se torna de gran dificultad.



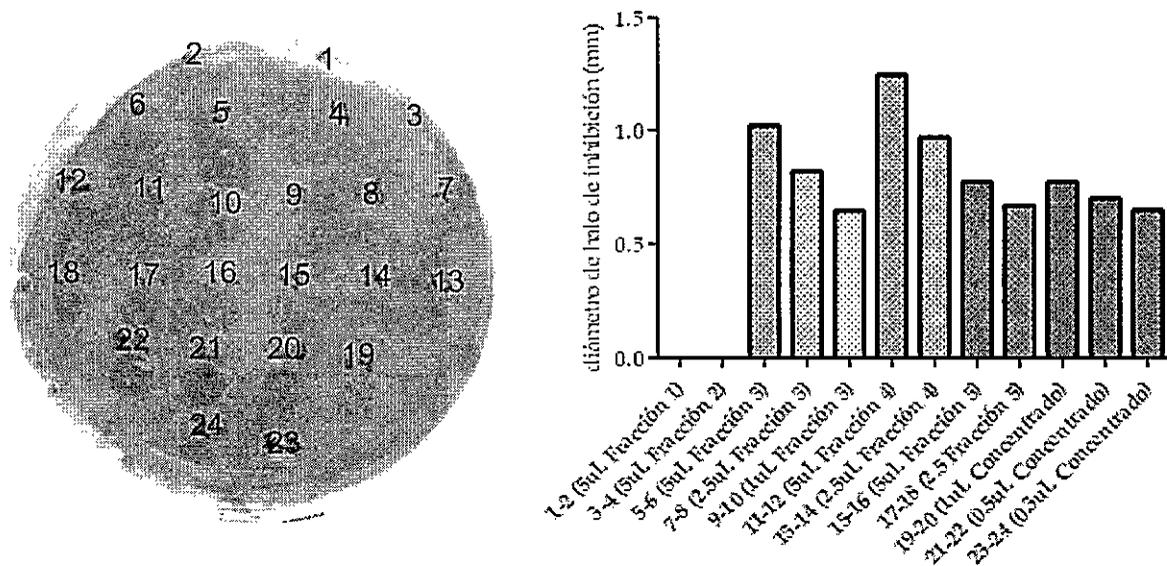
**Figura 7. Purificación parcial de hepcidina proveniente de medio condicionado de células HEK Hepc.** Esquema del procedimiento seguido para la purificación parcial de hepcidina recombinante desde medio enriquecido en hepcidina (desde células HEK TOPO y HEK Hepc), y de la comprobación de la presencia de hepcidina en cada una de las fracciones obtenidas, mediante cromatografía de intercambio catiónico, con un ensayo microbicida. La fotografía fue obtenida de la página web de American Type Culture Collection.

### 3.2.2 Actividad antimicrobiana de hepcidina recombinante purificada

Con el objetivo de verificar si las fracciones eluidas de la CIC conservan la actividad antimicrobiana de hepcidina, se realizó un ensayo de actividad microbicida de las mismas. Además, se verificó el efecto antimicrobiano al concentrar las fracciones, mediante tubos Centricon. Cabe destacar que en base a experimentos anteriores, las dos primeras eluciones fueron de 5mL pues luego de 10mL de elusión se comienza a ver

actividad en las fracciones, la que se mantiene en los próximos 18mL. Es por ello que la fracción 3 fue de 9mL, y las fracciones 4 y 5 de 4.5mL cada una.

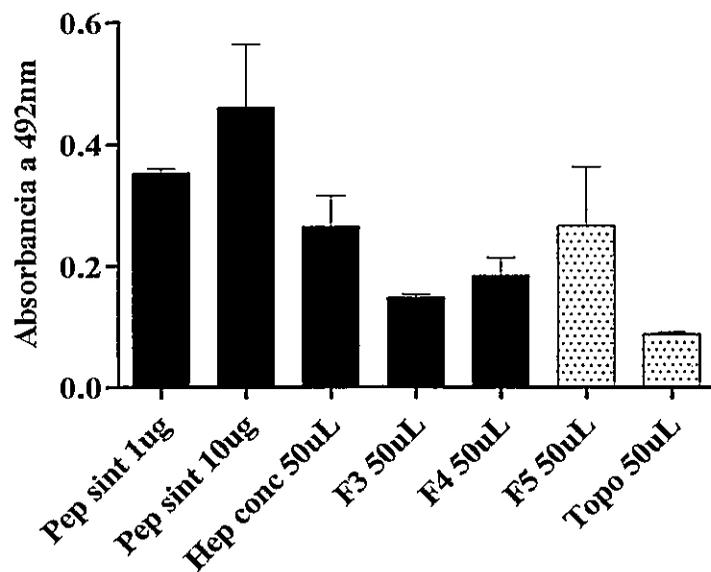
Los datos expuestos en la figura 8 muestran que la fracción 4 muestra la mayor actividad microbicida, tanto dentro de las fracciones de un mismo procedimiento de purificación como de las fracciones concentradas de un procedimiento anterior. Es por esto que esta fracción será la considerada para los ensayos posteriores.



**Figura 8.** Las fracciones obtenidas de la purificación parcial de hepcidina mediante Cromatografía de intercambio catiónico tienen actividad microbicida. Se tomó una alícuota, en duplicado, de cada fracción obtenida en la cromatografía de intercambio catiónico y se realizó un ensayo de actividad antimicrobiana. Este ensayo fue hecho en una placa de LB-Agar sembrada con un césped de bacterias *Escherichia coli* DH5a incubando ON, al siguiente día se midieron los halos de inhibición de cada alícuota, los que fueron expresados como el promedio de las dos mediciones. El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos independientes.

### 3.2.3 Inmunodetección de hepcidina mediante técnica de ELISA

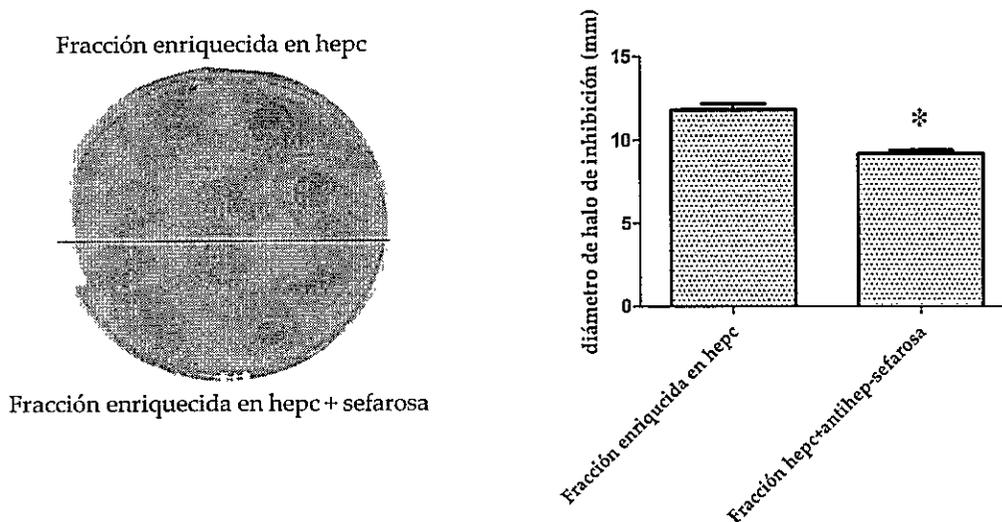
Con el objetivo de verificar la expresión proteica de hepcidina recombinante en las fracciones eluidas de la CIC, se realizó inmunodetección de hepcidina mediante la técnica ELISA. Para este procedimiento se utilizaron las fracciones de CIC que dieron mayor actividad microbicida (F3, F4 y F5). Además se utilizó un concentrado de fracciones obtenido en un procedimiento previo y el péptido sintético de hepcidina como control positivo. El anticuerpo utilizado fue suero inmune de conejo anti-hepcidina sintética. Como resultado, en la figura 9 se puede observar que F3, F4 y F5 son positivas para hepcidina de forma dosis dependiente, al comparar con el control negativo TOPO (fracción de CIC proveniente de medio condicionado de células HEK TOPO).



*Figura 9. Las fracciones provenientes de la CIC que presentan actividad microbicida presentan inmunoreactividad contra hepcidina en ensayo ELISA. Se tomó una alícuota de las fracciones provenientes de la cromatografía de intercambio catiónico, que presentaron actividad microbicida, y se realizó un ELISA para identificar la presencia del péptido hepcidina en cada una de ellas. Como control positivo se utilizó el péptido sintético hep25 y como control negativo se utilizó medio proveniente de células HEK TOPO. Todos los valores se encuentran expresados como el promedio de las mediciones, hechas en triplicado,  $\pm$  SEM. El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos independientes.*

### 3.2.4 Ensayo de actividad específica de hepcidina parcialmente purificada

Para verificar que el efecto antimicrobiano de hepcidina purificada es específico de este péptido, se realizó la unión del anticuerpo anti-hepcidina a sefarosa activada con bromuro de cianógeno. Este complejo anticuerpo-sefarosa fue incubado con una de las fracciones que presentan mayor actividad antimicrobiana, con el objetivo de mostrar que una vez hecho este procedimiento la actividad microbicida desaparece total o parcialmente. De esta forma, en la figura 10, se muestra que la actividad antimicrobiana de la fracción enriquecida en hepcidina disminuye significativamente, al incubarla con el anticuerpo anti-hepcidina unido a sefarosa, con respecto al control. Lo que demuestra que la actividad microbicida es propia del péptido hepcidina.



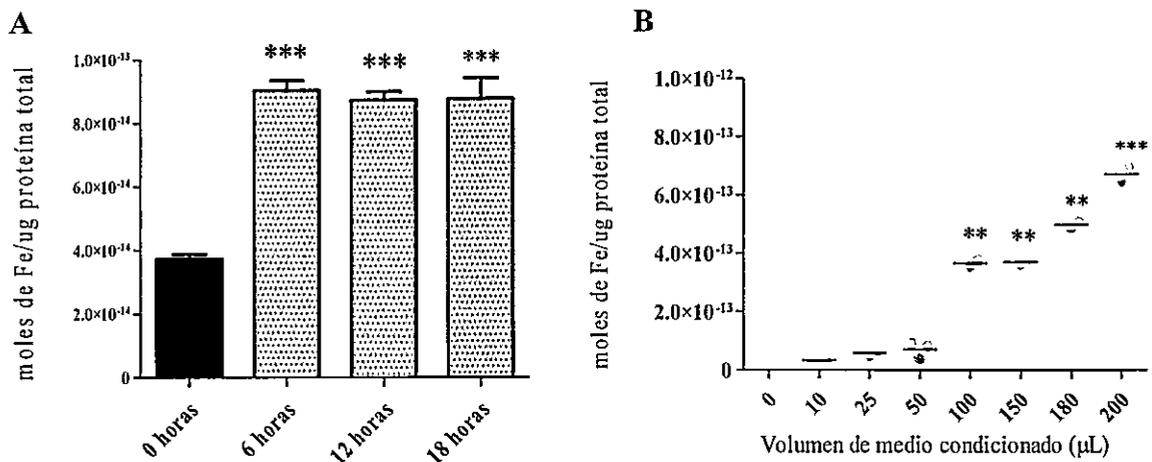
**Figura 10. Actividad microbicida de hepcidina parcialmente purificada es específica.**

Se tomó una alícuota de la fracción proveniente de la cromatografía de intercambio catiónico que presentó la mayor actividad microbicida, y se incubó con un medio que contenía el anticuerpo anti-hepcidina unido a sefarosa activada con bromuro de cianógeno. Luego de centrifugar la solución resultante con el objetivo de sedimentar hepcidina-antihepcidina-sefarosa, se rescató el sobrenadante y se comprobó su actividad microbicida versus una solución control sin este tratamiento. Los valores se encuentran expresados como el promedio de las mediciones, hechas en quintuplicado,  $\pm$  SEM. El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### 3.3 Caracterización del efecto de hepcidina en la homeostasis del hierro en neuroblastomas de humano.

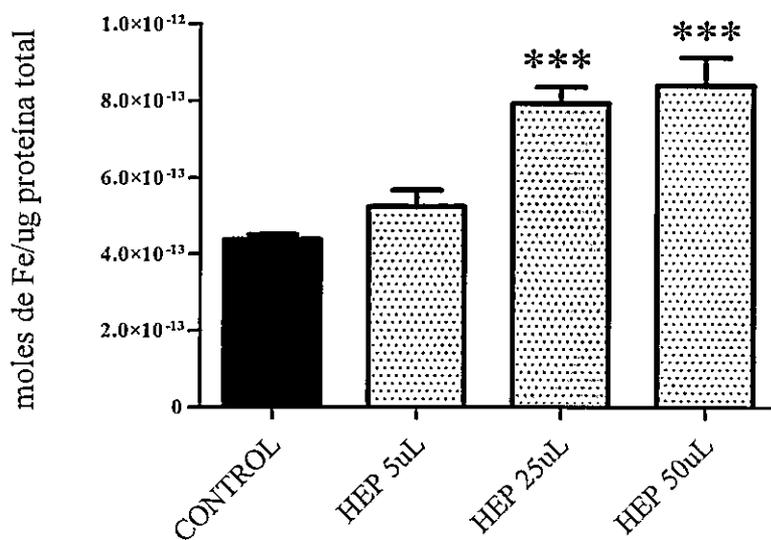
#### 3.3.1 Hepcidina induce un aumento en la incorporación de hierro marcado radiactivamente ( $^{55}\text{Fe-NTA}$ ) en células SH-SY5Y.

Con el objetivo de observar el efecto del péptido hepcidina en la incorporación de hierro marcado radiactivamente en un modelo neuronal se utilizó medio condicionado de células HepG2 y se incubó con las células SH-SY5Y durante diferentes tiempos, con diferentes diluciones del medio. En los gráficos de la figura 11, se muestra que el efecto de hepcidina es tiempo y dosis dependiente, generándose un aumento en la incorporación de hierro marcado en ambos casos.



**Figura 11.** Hepcidina, proveniente de células HepG2, induce un aumento en la incorporación de hierro marcado radiactivamente en células SH-SY5Y, de forma tiempo y dosis dependiente. Células SH-SY5Y fueron tratadas con medio enriquecido en hepcidina proveniente de células HepG2. En A: Células SH-SY5Y fueron tratadas durante distintos tiempos con medio condicionado desde células HepG2. En B: Células SH-SY5Y fueron tratadas con distintos volúmenes de medio condicionado desde células HepG2 en un volumen total de 500 $\mu\text{L}$  de OptiMEM. Los valores se encuentran expresados como el promedio de las mediciones, hechas en triplicado,  $\pm$  SEM. El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*).

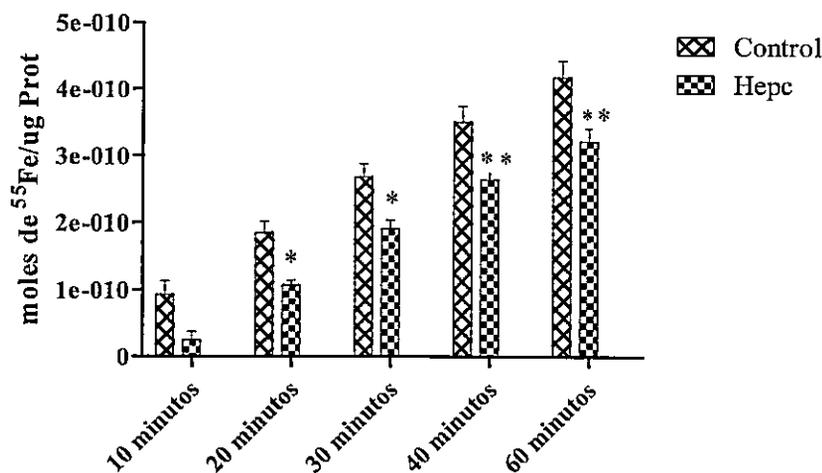
Para determinar si el medio condicionado purificado por CIC, proveniente de células HEK Hepc, mantiene su actividad, se realizó el mismo experimento de incorporación de hierro marcado radiactivamente. Este procedimiento se realizó incubando con distintos volúmenes de medio purificado, en un total de 500uL de MEM F12 10% SFB durante 6 horas. Así, en la figura 12, se muestra que tal como ocurrió al ocupar medio condicionado proveniente de células HepG2, hepcidina recombinante parcialmente purificada es capaz de aumentar la incorporación de hierro marcado radiactivamente en células SH-SY5Y.



**Figura 12.** *Hepcidina recombinante, parcialmente purificada, induce un aumento en la incorporación de hierro marcado radiactivamente en células SH-SY5Y. Células SH-SY5Y fueron tratadas, durante 6 horas, con un volumen total de 500 µL de medio MEM-F12 10%SFB. A este medio se le agregó distintos volúmenes de la fracción proveniente de la CIC que presentó mayor actividad microbicida. Posteriormente, se midió la entrada de hierro radiactivo. Los valores se encuentran expresados como el promedio de las mediciones, hechas en triplicados, ± SEM. El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*)*.

### 3.3.2 Hecpidina induce una disminución en la salida de hierro marcado radiactivamente ( $^{55}\text{Fe-NTA}$ ) en células SH-SY5Y

Basándose en la literatura, donde se ha descrito que la función de hepcidina es internalizar al exportador exclusivo de hierro, IREG1 (Nemeth y col., 2004b). Se determinó si el aumento en la incorporación de hierro marcado radiactivamente en el neuroblastoma de humano se debe también a una disminución en la salida del mismo. Es por esto que se evaluó la salida de hierro marcado a diferentes tiempos luego de una incubación de 6 horas con hepcidina y de 30 minutos con hierro marcado a 37°C. Como se observa en la figura 13, al tratar las células con medio enriquecido en hepcidina se produce una disminución significativa de la salida de hierro marcado radiactivamente, comparado con el control.

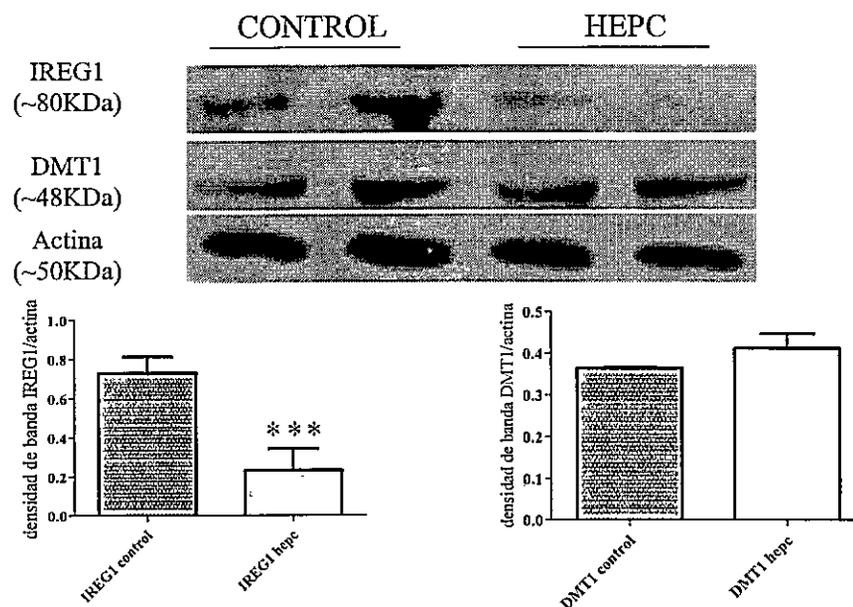


**Figura 13.** Hecpidina induce una disminución en la salida de hierro marcado radiactivamente en células SH-SY5Y. Células SH-SY5Y fueron tratadas durante 6 horas con medio condicionado de células HepG2 enriquecido en hepcidina. Luego se incubó durante 30 minutos con  $^{55}\text{Fe-NTA}$  y, tras lavar las células, se tomaron alícuotas de medio fresco de cultivo tras 0, 10, 20, 30, 40 y 60 minutos. Los valores se encuentran expresados como el promedio de las mediciones, hechas en triplicado,  $\pm$  SEM y se encuentran normalizados con el tiempo 0 minutos. El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*).

### 3.4 Expresión de proteínas involucradas en la homeostasis del hierro.

#### 3.4.1. Hecpidina modula la expresión de proteínas involucradas en la homeostasis del hierro.

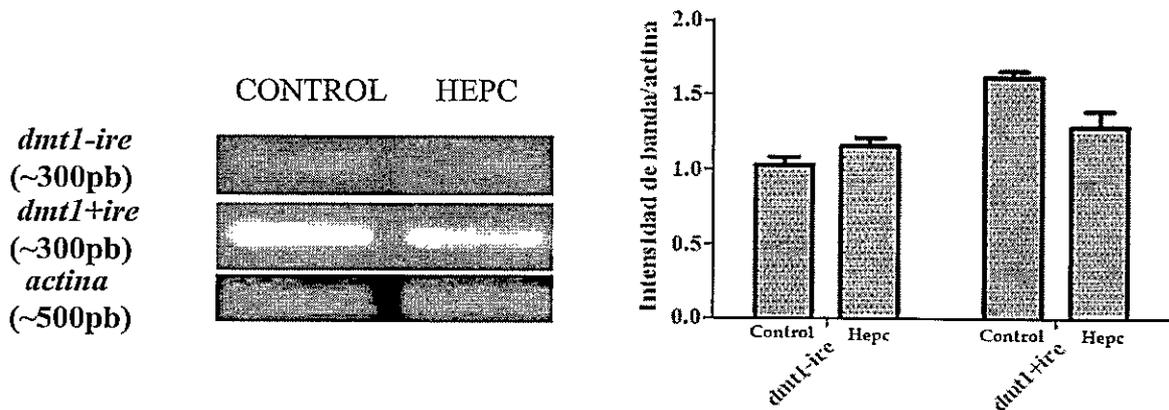
Evaluamos si el efecto de hepcidina en la incorporación de hierro marcado es reflejado en los niveles de proteínas involucradas en el metabolismo del hierro. Para ello, se realizó una inmunodetección mediante la técnica de western blotting de un extracto de proteínas de células SH-SY5Y, tras una incubación de 6 horas con hepcidina parcialmente purificada. Como se observa en la figura 15, células tratadas con hepcidina parcialmente purificada presentan una disminución significativa de la proteína IREG1, pero no así de DMT1.



**Figura 15. Hepcidina induce una disminución de la proteína exportadora de hierro IREG1 pero no del importador de hierro DMT1.** Luego de realizar extracto de proteínas totales de células SH-SY5Y controles y tratadas con hepcidina parcialmente purificada, se realizó un western blot contra DMT1, IREG1 y actina. Posteriormente se realizó una densitometría de las bandas resultantes del procedimiento anterior. Todos los valores se encuentran expresados como el promedio de las mediciones  $\pm$  SEM. El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### 3.4.2. Expresión de ARNm de *dmt1*.

Datos obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio muestran que hepcidina, en línea celular de enterocito Caco-2, afecta la expresión del ARNm de *dmt1*, el principal transportador de entrada de hierro (Mena y col., 2008). Es por esto que se evaluó la expresión del ARNm del gen que codifica para esta proteína mediante RT-PCR semicuantitativo, tanto para la forma sensible a hierro *+ire*, como la no sensible a hierro *-ire*. Como control de carga se utilizó el ADNc del gen que codifica para actina. En la figura 16, se muestra que hepcidina parcialmente purificada no induce cambios significativos en el ADNc de las isoformas *-ire* y *+ire* de *dmt1*.

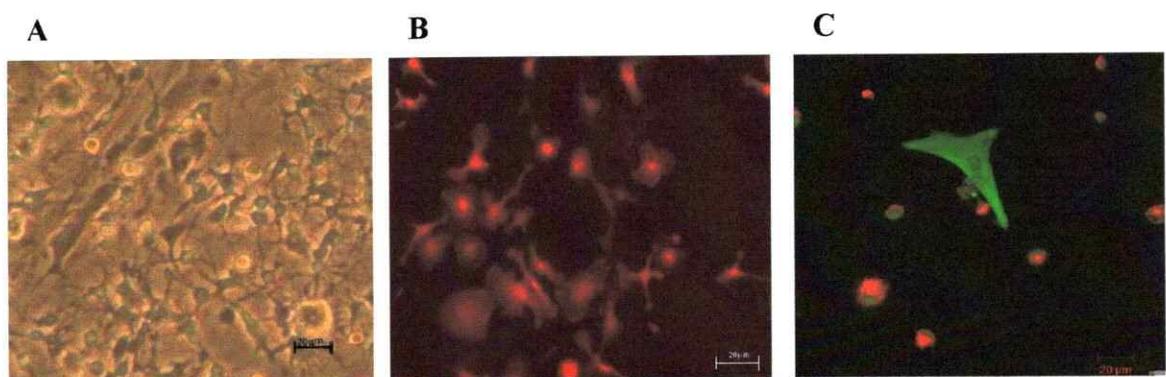


**Figura 16.** *Hepcidina no induce cambios en la expresión del ARNm que codifica para las isoformas de dmt1 en células SH-SY5Y. Luego de obtener ADNc de células SH-SY5Y controles y tratadas con hepcidina parcialmente purificada, se realizó un RT-PCR semicuantitativo contra dmt1-ire y dmt1+ire y actina. Posteriormente se realizó una densitometría de las bandas resultantes del procedimiento anterior. Todos los valores se encuentran expresados como el promedio de las mediciones  $\pm$  SEM. El experimento mostrado es representativo de 2 experimentos independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*)*.

### 3.5. Caracterización de la expresión y el efecto de hepcidina en cultivo primario de rata.

#### 3.5.1 Aislamiento de astrocitos y microglías desde cultivo mixto de glías de rata

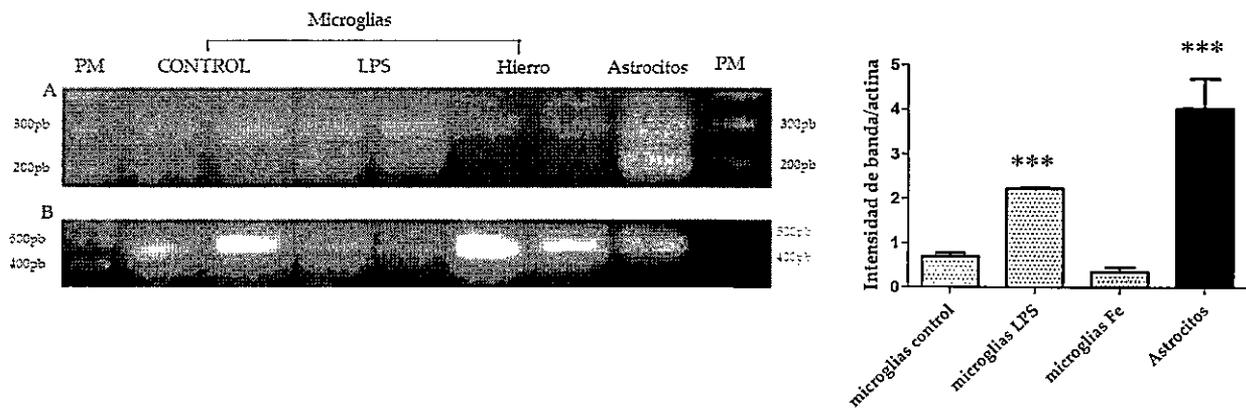
Se ha descrito que hepcidina se expresa en el cerebro, tanto en glías como en neuronas; por lo tanto el efecto de este péptido sobre las neuronas puede ser autocrino o paracrino (Zechel y col., 2006). Como se ha descrito que monocitos/macrófagos son capaces de producir hepcidina (Theurl y col., 2008; Peyssonnaud y col., 2006), se realizó un aislamiento de células microgliales y astrocíticas para observar si estas poseen la misma capacidad de los macrófagos y si esto es alterado en presencia de LPS o diferentes concentraciones de hierro. En la figura 17, se muestran imágenes de cultivo mixto de glías de 25 días (A); una inmunocitoquímica de un cultivo purificado de células microgliales (isolectina G5-IB4 positivas, en rojo) (B); y una inmunocitoquímica doble, donde se muestran células astrocíticas (GFAP positivas, en verde) y microgliales (en rojo) (C).



*Figura 17. Separación de células microgliales desde cultivo mixto de glías de rata. En A se muestra un cultivo mixto de glías de rata de 25 días de cultivo. En B se muestra una inmunocitoquímica en donde se muestran células microgliales aisladas en rojo. Por último, en C se muestra una inmunocitoquímica doble con los dos tipos celulares mencionados, microglías en rojo y astrocitos en verde.*

### 3.5.2 Expresión de ARNm de hepcidina en astrocitos y microglías

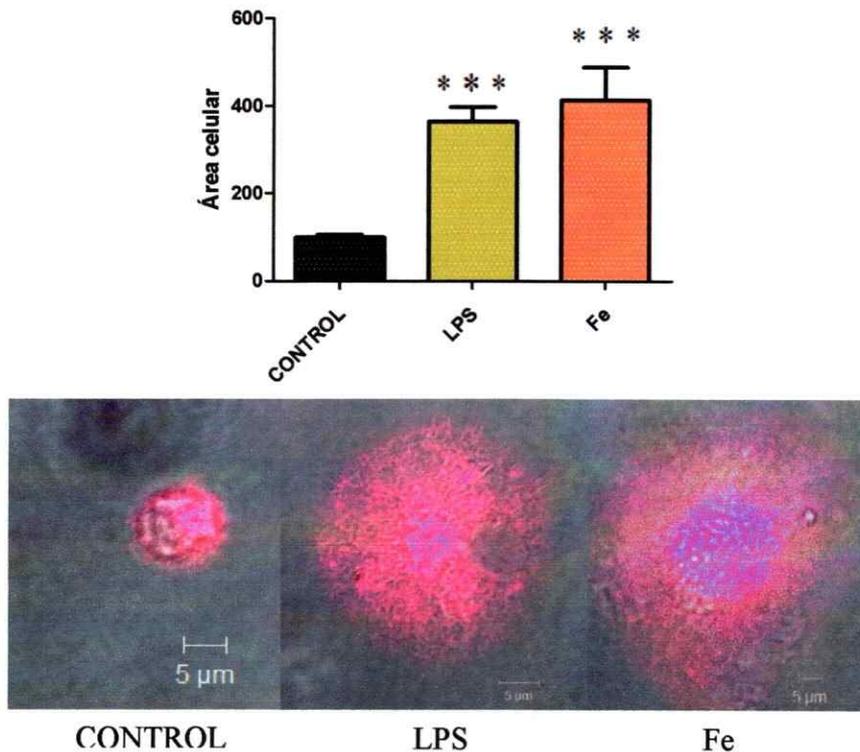
Para determinar la expresión del ARNm de hepcidina en astrocitos y microglías se realizó, desde un cultivo primario mixto de glías de rata, una separación de estos tipos celulares y se extrajo ARNm. Posteriormente se realizó un RT-PCR semicuantitativo, utilizando partidores específicos de hepcidina de rata, los cuales amplifican un fragmento esperado de 190pb. El resultado de este experimento, en la figura 18, muestra que tanto células microgliales como astrocíticas poseen expresión de ADNc de hepcidina.



**Figura 18. Células microgliales y astrocíticas expresan el ARNm de hepcidina.** En la figura se muestra un gel de agarosa con los productos de PCR de ADNc obtenido desde células microgliales controles, células microgliales tratadas con LPS 50ng/mL y con Fe-NTA 40uM; y de células astrocíticas controles. Todos los tratamientos fueron hechos durante 6 horas. Se realizó un RT-PCR semicuantitativo contra hepcidina (A) y actina (B). En el primer carril se encuentran las banda correspondiente al marcador de peso molecular; en el segundo y tercer carril se encuentra el ADNc amplificado de microglías controle; en el cuarto y quinto carril se encuentran las bandas correspondientes al ADNc amplificado de microglías tratadas con LPS; en el sexto y séptimo carril se encuentran las bandas correspondientes al ADNc amplificado de microglías tratadas con Fe-NTA; en el octavo carril se encuentran las bandas correspondientes al ADNc amplificado de astrocitos controles; y por último, en el noveno carril se encuentra nuevamente la banda correspondiente al estándar de peso molecular. Posteriormente se realizó una densitometría de las bandas resultantes de este gel de agarosa. Todos los valores se encuentran expresados como el promedio de las mediciones  $\pm$  SEM. El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*).

### 3.5.3 Efecto del hierro en cultivo primario de microglías

Debido a que las microglías expuestas a concentraciones altas de Fe-NTA mostraron un fenotipo diferente a las microglías control y a las tratadas con LPS, se realizaron experimentos para verificar si el hierro ejerce algún efecto a nivel de activación microglial. En la figura 19 se muestran imágenes de microscopía confocal representativas, para mostrar el hierro es capaz de generar un cambio significativo en la morfología microglial, tal como ocurre al tratar las células con LPS, el que es capaz de generar activación microglial. Tal cambio, fue cuantificado midiendo área celular



**Figura 19. Efecto del hierro en morfología de células microgliales.** Luego de separar las células microgliales desde el cultivo mixto de glías de rata, estas fueron tratadas con un estímulo inflamatorio (LPS) y con hierro (30µM) durante 6 horas. Tras este periodo se realizó una inmunocitoquímica contra isolectina G5-IB4 y se observó morfología por microscopía confocal. Los valores mostrados en el gráfico se encuentran expresados como el promedio de las mediciones  $\pm$  SEM,  $n=35$ . El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*).

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Obtención de hepcidina parcialmente purificada.

Como se mencionó anteriormente, la estrategia inicial usada en este trabajo para la obtención de hepcidina fue mediante la utilización de la línea celular de carcinoma de hígado de humano, células HepG2. Esto debido a que el hígado es el principal productor de hepcidina y que trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio indican que este tipo celular es capaz de producir hepcidina, tanto en condición control como en condiciones de alta concentración de hierro, donde la secreción de este péptido es considerablemente mayor (Mena y col., 2008).

Sin embargo por problemas del tipo experimental, este método fue reemplazado por la utilización de células HEK293 transfectadas con dos constructos generados con anterioridad en nuestro laboratorio: pcDNA3.1/Hepcidina-V5-His-TOPO y su vector vacío pcDNA3.1/V5-His-TOPO. En la literatura, está descrito que estas células son capaces de secretar el péptido recombinante al medio de cultivo, lo que facilita en gran medida el procedimiento de purificación (Wallace y col., 2006).

Dentro de las ventajas del segundo procedimiento se encuentra el corto tiempo generacional que poseen las células HEK293 con respecto a las células HepG2. Además las células HEK293 no necesitan ser estimuladas con altas concentraciones de hierro, pues el promotor presente en el constructo es constitutivo, lo que simplifica el método experimental pues en el procedimiento anterior era necesario usar un quelante para quitar el exceso de hierro en el medio condicionado.

Por otro lado, con el objetivo de purificar hepcidina, se utilizaron dos columnas, una de intercambio catiónico (CIC) y otra de níquel. Sin embargo solo la primera fue efectiva y suficiente para el desarrollo de este trabajo, es por esto que se habla de una purificación parcial de este péptido.

El resultado de la purificación parcial de hepcidina fue tan efectiva que con pequeños volúmenes se pudo obtener actividad microbicida (desde 0.5uL) y aumento de la incorporación de hierro marcado de manera significativa en células SH-SY5Y (diluciones desde 1:400); mismo efecto obtenido con medios condicionados desde células HepG2 con volúmenes considerablemente mayores (diluciones desde 1:5). Esto es de suma relevancia pues en el primer método, utilizando células HepG2, las células de neuroblastoma debían ser tratadas con medio OptiMEM, medio que no posee suero, condición que podría haber afectado los resultados.

Por último cabe destacar que, una vez iniciado este seminario de título, la obtención de hepcidina mediante células HepG2, era la única forma conocida en nuestro laboratorio para la obtención de este importante péptido catiónico. Por lo tanto, la estandarización de este nuevo método en conjunto con las ventajas antes mencionadas, transforma este trabajo de tesis en una herramienta de gran utilidad para futuras investigaciones.

#### **4.2 Aumento de la incorporación de hierro marcado en células SH-SY5Y por efecto de hepcidina.**

Según los resultados expuestos en la figura 15, hepcidina indujo una disminución de la proteína exportadora de hierro IREG1, posiblemente debido a su internalización y

posterior degradación (Nemeth y col., 2004b). Esto, a su vez, podría dar cuenta del aumento observado en la incorporación de hierro marcado radiactivamente y de la disminución de la salida del mismo en células de neuroblastoma de humano SH-SY5Y (figuras 11-12 y 13 respectivamente). Esto muestra que, en las células SH-SY5Y, hepcidina induce los mismos cambios observados en macrófagos, células HeLa y células HEK293 (Theurl y col., 2008; Chaston y col., 2008; Peyssonnaud y col., 2006; Nemeth y col., 2004b); y el efecto contrario al observado en células del epitelio intestinal (Mena y col., 2008; Chaston y col., 2008), donde hepcidina induce una disminución de la expresión del transportador de entrada de hierro a la célula DMT1; efecto no observado en este trabajo (figuras 15 y 16). Solo cabe mencionar una tendencia a la disminución de la isoforma +IRE al tratar las células con hepcidina (figura 16), lo que podría deberse a la acumulación de hierro intracelular y a la posterior desestabilización de su ARNm mediada por el sistema IRE/IRP (Klausner y col., 1993; Hentze y Kuhn 1996)

#### **4.3 Expresión de ARNm de hepcidina en astrocitos y microglías.**

La expresión de hepcidina en células GFAP positivas está descrita en la literatura (Zechel y col., 2006). Sin embargo no se había realizado un estudio detallado para observar si otros tipos celulares son productores de este péptido.

Se ha demostrado ampliamente en la literatura que los macrófagos son productores de hepcidina (Theurl y col., 2008; Peyssonnaud y col., 2006). No obstante, hasta el momento, este es el primer trabajo que describe explícitamente que las microglías, del mismo linaje celular de los macrófagos, son capaces de producir

hepcidina, o por lo menos, expresar el ARNm que codifica para este péptido (Figura 18). Es importante recalcar que la mayor expresión de ARNm de hepcidina se encuentra al tratar las células microgliales con LPS y no con altas concentraciones de hierro, lo que habla de un mecanismo de expresión diferente del observado en células hepáticas, pero similar al observado en macrófagos (Theurl y col., 2008). Esto es de suma relevancia ya que muchos investigadores creen que tanto la inflamación mediada por actividad microglial como un desregulación de la homeostasis del hierro son procesos iniciadores de cuadros neurodegenerativos.

Como se observó en la figura 18, los astrocitos también son capaces de expresar hepcidina e incluso, en mayor cantidad que las microglías. Dicho tipo celular posee, por sobretodo, un papel neuroprotector dentro del sistema nervioso central; sin embargo, bajo condiciones de trauma o en la misma EP, también es capaz de entrar en un estado reactivo y participar en la respuesta inmunoinflamatoria junto con las células microgliales activadas (McGeer P y McGeer E; 2008; Laird y col., 2008). Futuras investigaciones podrán evaluar si la producción de hepcidina por glías forma parte de la cascada de eventos que llevan a procesos neurodegenerativos.

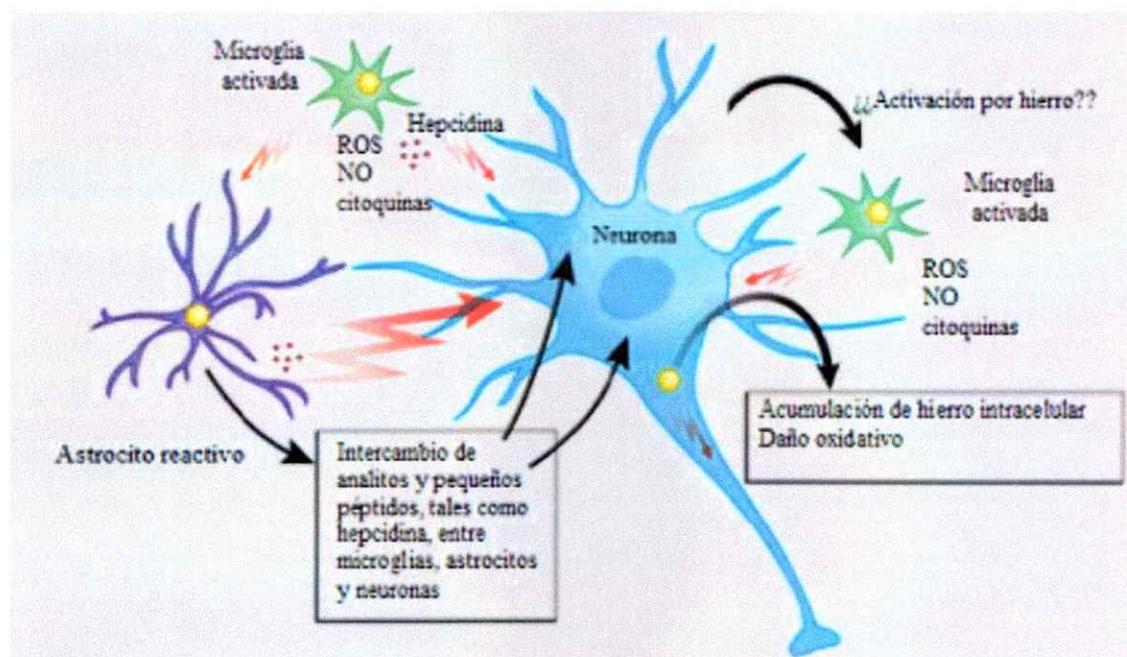
Cabe destacar, que no se descarta una producción autocrina de hepcidina, pues aunque dicha expresión no fue identificada en el tipo celular estudiado (datos no mostrados) en la literatura se ha descrito que células NeuN positivas colocalizan con la marca para hepcidina (Zechel y col., 2006).

#### **4.4 Efecto del hierro en cultivo primario de microglías**

Dentro de los estímulos capaces de activar las células microgliales se encuentran factores como infección, trauma, LPS y ROS; y recientemente se describió que ceruloplasmina, una proteína asociada a cobre, es capaz de activar a las células microgliales (Kyung-Hee y col., 2007). Por esto, es sustentable pensar que el hierro puede activar a las células microgliales ya sea por sí mismo o por su capacidad de producir ROS. Esto, sin olvidar que en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, se produce una gran acumulación de hierro dentro de células gliales como microglías activadas, macrófagos y oligodendrocitos (Youdim y Riederer, 1993). Según los resultados mostrados en la figura 19, el hierro genera un cambio morfológico en las microglías similar al observado al incubarlas con LPS, lo que podría indicar que el hierro induce una respuesta inflamatoria en microglías. Cabe destacar que el porcentaje de microglías tratadas con hierro que presentaron este cambio morfológico, con respecto a las controles, es levemente menor en las tratadas con LPS.

Sin embargo, la sola evaluación de morfología microglial no es suficiente para afirmar activación de estas. Son necesarios otros estudios como la evaluación de producción de nitritos, expresión de nNOS y la capacidad fagocítica, para afirmar que el hierro es uno de los factores capaces de activar microglías. No obstante, es interesante pensar en un mecanismo de retroalimentación en la cual hepcidina tenga un papel central. En el, una activación microglial produciría hepcidina, la que a su vez produciría un aumento de hierro en las neuronas y posiblemente también en las mismas microglías (tal como se observa en macrófagos (Theurl y col., 2008; Peyssonnaud y col., 2006)) lo que a su vez produciría más activación microglial.

Por último, los resultados descritos en este trabajo de tesis dejan una puerta abierta para futuras investigaciones, que permitan ligar a este importante péptido en procesos de neuroinflamatorios asociados a un desbalance en la homeostasis del hierro. Y permiten también, plantear el siguiente mecanismo:



**Figura 18. Mecanismo propuesto sobre la relación entre hepcidina, la homeostasis del hierro y el sistema inmune en un modelo neuronal.** El mecanismo muestra el posible efecto de hepcidina, en la homeostasis del hierro, sobre una neurona que ya se encuentra bajo un cuadro inflamatorio (donde microglia y astrocitos se encuentran reactivos). También da cuenta de una posible retroalimentación positiva, donde el hierro es capaz de desencadenar más activación microglial, potenciándose el daño oxidativo.

## 5. CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis, se generó un método rápido y efectivo para obtener hepcidina recombinante, objetivo ampliamente buscado por nuestro laboratorio.

Además, se caracterizó el efecto de hepcidina en la homeostasis del hierro en la línea celular de neuroblastoma de humano, SH-SY5Y. Este es el primer trabajo que describe el efecto de este importante péptido en un modelo neuronal, y en él se demostró que hepcidina genera una disminución del exportador de hierro, IREG1, lo que genera un desbalance en la homeostasis del hierro. Los resultados mostrados son suficientes para mostrar que en neuronas, hepcidina ejerce un efecto similar al producido en macrófagos, células HeLa y células HEK293, en los cuales se produce una acumulación de hierro intracelular (Theurl y col., 2008; Peyssonnaud y col., 2006; Nemeth y col., 2004b) y contrario al observado en células del epitelio intestinal (Mena y col., 2008).

Por otra parte, se describió la expresión de hepcidina en un tipo celular que no había sido investigado hasta ahora, las microglías. Esto, sumado a la expresión de hepcidina en astrocitos, le da sentido a un posible rol de hepcidina en la homeostasis del hierro en neuronas, sin descartarse una producción autocrina del péptido (Zechel y col., 2006).

A pesar de que no se evaluó detalladamente el efecto del hierro en cultivo primario de microglías, sí se dejó abierta la interrogante sobre si este reactivo metal divalente es capaz de generar activación microglial. Si esto se demostrara, pondría al hierro como eje central del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la

enfermedad de Parkinson, donde la activación microglial y la acumulación de hierro son dos de los principales partícipes de la etiología de la enfermedad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre P., Mena N., Tapia V., Arredondo M., Nuñez M.T. (2005). Iron homeostasis in neuronal cells: a role for IREG1. *BMC Neurosci* 24; 6(1): 3.
2. Arai H., Furuya T., Yasuda T., Miura M., Mizuno Y., Mochizuki H. (2004). Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1beta, and expression of caspase-11 in mice. *J Biol Chem* 279(49):51647-51653.
3. Babitt J., Huang F., Weighting D., Xia Y., Sidis Y., Samad T., Campagna J., Chung R., Schneyer A., Woolf C., Andrews N., Lin H., (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* 38: 531-539
4. Bédard A., Tremblay P., Chernomoretz A., Vallières L. (2007). Identification of genes preferentially expressed by microglia and upregulated during cuprizone-induced inflammation. *Glia* 55: 777-789
5. Block M., Zecca L., y Hong J.S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8(1): 57-69
6. Britton R.S., Ramm G.A., Olynyk J., Singh R., O'Neill R., Bacon B.R. (1994). Pathophysiology of iron toxicity. *Adv Exp Med Biol* 356:239-253
7. Chaston T., Chung B., Mascarenhas M., Marks J., Patel B., Srail S.K., Sharp P. (2008). Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut*.57: 374-382

8. **Chew L. J., Takanohashi A., Bell M. (2006).** Microglia and inflammation: Impact on developmental brain injuries. *Men Ret Dev Dis Res Rev* 12(2): 105-112
9. **Choi S., Cho Y., Kim H., Park J., (2007).** ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting. *Biochem Biophys Res Comm* 356: 312–317
10. **Corre S. y Galibert M.D. (2005).** Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res* 18: 337–348
11. **Courselaud B., Pigeon C., Inoue Y., Inoue J., Gonzalez F., Leroyer P., Gilot D., Boudjema K., Guguen-Guillouzo C., Brissot P., Lore'al O., Ilyin G. (2002).** C/EBP regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. *J Biol Chem* 277(43): 41163-41170
12. **De Domenico I., Ward D.M., Langelier C., Vaughn M.B., Nemeth E., Sundquist W.I., Ganz T., Musci G., Kaplan J. (2007).** The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 18: 2569–2578
13. **De Pablos R.M., Herrera A.J., Villarán R.F., Cano J., Machado A. (2005)** Dopamine-dependent neurotoxicity of lipopolysaccharide in substantia nigra. *FASEB J* 19(3):407-409
14. **Donovan A., Brownlie A., Zhou Y., Shepard J., Pratt S.J., Moynihan J., Paw B.H., Drejer A., Barut B., Zapata A., Law T.C., Brugnara C., Lux S.E., Pinkus G.S., Pinkus J.L., Kingsley P.D., Palis J., Fleming M.D., Andrews N.C., Zon L.I. (2000).** Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403, 776–781

15. **Fleming M.D., Romano M.A., Su M.A., Garrick L.M., Garrick M.D., Andrews NC. (1998).** Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1148-1153
16. **Galibert M.D., Carreira S., Goding C. (2001).** The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced *Tyrosinase* expression. *EMBO J* 20(17): 5022-5031
17. **Ganz T. (2003).** Heparidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 103:783-788
18. **Ganz T. (2005).** Heparidin, a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol* 18: 171-182
19. **González-Chávez S.A., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q. (2008).** Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents* (Artículo en prensa)
20. **Goss J.A., Seu P., Gao F.Q., Wyllie S. (2005).** Ischemia-reperfusion of rat liver modulates heparidin in vivo expression. *Liver Transpl* 11(7):800-806
21. **Graham R.M., Chua A.C., Herbison C.E., Olynyk J.K., Trinder D. (2007).** Liver iron transport. *World J Gastroenterol* 13(54): 4725-4736
22. **Harrison P.M. y Arosio P. (1996).** The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1275 (3): 161-203
23. **Harrison-Findik D.D., Schafer D., Klein E., Timchenko N.A., Kulaksiz H., Clemens D., Fein E., Andriopoulos B., Pantopoulos K., Gollan J. (2006).** Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates heparidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem* 281: 22974-22982

24. **Hentze M.W. y Kühn L.C. (1996).** Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci, USA* 93: 8175-8182
25. **Hentze M.W., Muckenthaler M.U, Andrews N.C. (2004).** Balancing Acts: Molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117:285-297
26. **Hirsch E.C., Hunot S., Hartmann A. (2005).** Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 11 Suppl 1:S9-S15
27. **Kaldy P., Menotti E., Moret R., Kühn L.C. (1999).** Identification of RNA-binding surfaces in iron regulatory protein-1. *EMBO J* 18(21):6073-6083
28. **Klausner R.D., Rouault T.A., Harford J.B. (1993).** Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* 72: 19-28
29. **Koprlich J.B., Reske-Nielsen C., Mithal P., Isacson O. (2008).** Neuroinflammation mediated by IL-1beta increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 27: 5-8
30. **Krause A., Neitz S., Magert H.J., Schulz A., Forssmann W.G., Schulz-Knappe P., Adermann K. (2000).** LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 480:147-150
31. **Kyung-Hee L., Su-Jin Y., Kyong N.N., Yong S.G., Eunjoo H.L. (2007).** Activation of microglial cells by ceruloplasmin. *Brain Res* 1171: 1-8
32. **Laird M.D., Vender J.R., Dhandapani K.M. (2008).** Opposing roles for reactive astrocytes following traumatic brain injury. *Nuerosignals* 16(2-3): 154-164

33. **Latunde-Dada G.O., Van der Westhuizen J., Vulpe C.D., Anderson G.J., Simpson R.J., McKie A.T. (2002).** Molecular and functional roles of duodenal cytochrome B (Dcytb) in iron metabolism. *Blood Cells Mol Dis* 29: 356-360
34. **Lee P., Peng H., Gelbart T., Wang L., Beutler E. (2005).** Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 1906-1910
35. **Lekstrom-Himes J., y Xanthopoulos K. (1998).** Biological role of the CCAAT/Enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* 273 (44): 28545-28548
36. **Leonarduzzi G., Scavazza A., Biasi F., Chiarotto E., Camandola S., Vogel S., Dargel R., Poli G. (1997).** The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2, 3-nonenal up regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J* 11:851-857
37. **Li G., Sun S., Cao X., Zhong J., Tong E. (2004).** LPS-induced degeneration of dopaminergic neurons of substantia nigra in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 24(1):83-86.
38. **Logroscino G., Marder K., Graziano J., Freyer G., Slavkovich V., LoIacono N., Cote L. and Mayeux R. (1997).** Altered systemic iron metabolism in Parkinson's disease. *Neurology* 49:714-717
39. **Lou D.Q., Nicolas G., Lesbordes J.C. y col. (2004).** Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood* 103 2816-2821

40. MacKenzie E.L., Iwasaki K., Tsuji Y. (2008). Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 10(6):997-1030.
41. Martin W.R., Wieler M., Gee M. (2008). Midbrain iron content in early Parkinson disease: a potential biomarker of disease status. *Neurology*. 70:1411-1417.
42. McGeer P.L. y McGeer E.G. (2008). Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23(4):474-483
43. Mena N., Esparza A., Tapia V., Valdés P., M.T. Nuñez (2008). Heparin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(1):G192-198
44. Nemeth E., Valore E., Territo M., Schiller G., Lichtenstein A., Ganz T. (2003). Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101(7): 2461-2463
45. Nemeth E., Rivera S., Gabayan V., Keller C., Taudorf S., Pedersen B.K., Ganz T. (2004a). IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone heparin. *J Clin Invest* 113(9):1271-1276
46. Nemeth E., Tuttle M.S., Powelson J., Vaughn M.B., Donovan A., Ward D.M., Ganz T., Kaplan J. (2004b). Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306 (5704):2090-2093
47. Nguyen N.B., Callaghan K.D., Ghio A.J., Haile D.J., Yang F. (2006). Heparin expression and iron transport in alveolar macrophages *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L417-L425

48. Nicolas G., Bennoun M., Devaux I., Beaumont C., Grandchamp B., Kahn A., Vaulont S. (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8780-8785
49. Nicolas G., Bennoun M., Porteu A., Mativet S., Beaumont C., Grandchamp B., Sirtito M., Sawadogo M., Kahn A., Vaulont, S. (2002a). Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Nat Acad Sci USA* 99: 4596-4601
50. Nicolas G., Chauvet C., Viatte L., Danan JL., Brigard X., Devaux I., Beaumont C., Kahn A., Vaulont S. (2002b). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation. *J Clin Invest* 110(7):1037-1044
51. Oakley A.E., Collingwood J.F., Dobson J., Love G., Perrott R., Edwardson J.A., Elstner M., Morris C.M. (2007). Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. *Neurology* 68(21):1820-1825
52. Park C.H., Valore E.V., Waring, AJ., Ganz T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276, 7806–7810
53. Perry G., Taddeo M.A., Petersen R.B., Castellani R.J., Harris P.L.R., Siedlak S.L., Cash A.D., Liu Q., Nunomura A., Atwood C.S., Smith M.A. (2003). Adventiously-bound redox active iron and copper are at the center of oxidative damage in Alzheimer disease. *Biometals* 16: 77–81
54. Petrak J., Vyoral D. (2005). Hephaestin— a ferroxidase of cellular iron export. *Int J Biochem Cell Biol* 37(6): 1173-1178

- 55. Peyssonnaud C., Zinkernagel A., Datta V., Lauth X., Johnson R. S., and Nizet V. (2006).** TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood* 107: 3727-3732
- 56. Pietrangelo A., Dierssen U., Valli L., Garuti C., Rump A., Corradini E., Ernst M., Klein C., Trautwein C. (2007).** STAT3 Is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology* 132:294-300
- 57. Pigeon C., Ilyin G., Courseland B., Leroyer P., Turlin B., Brissot P., Loreal O. (2001).** A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276(11):7811-7819
- 58. Ponka P. (1997).** Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* 89: 1-25
- 59. Qin W., Fang D., Zhong-Ming Q., Hu G.X., Li Z., Ho Y.W., Lein Y., Ya K. (2008).** Lipopolysaccharide induces a significant increase in expression of iron regulatory hormone hepcidin in the cortex and substantia nigra in rat brain. *Endocrinology* (Artículo en prensa)
- 60. Salazar J., Mena N., Nuñez M.T. (2006).** Iron dyshomeostasis in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 71:205-213
- 61. Siah CW., Ombiga J., Adams LA., Trinder D., Olynyk JK. (2006).** Normal Iron Metabolism and the Pathophysiology of Iron Overload Disorders. *Clin Biochem Rev* 27: 5-16

62. **Smith M.A., Harris P.L.R., Sayre L.M., Perry G. (1997).** Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9866-9868
63. **Song J., Duncan M., Li G., Chan Ch., Grady R., Stapleton A., Abraham S. (2007).** A novel TLR4-mediated signaling pathway leading to IL-6 responses in human bladder epithelial cells. *Plos Pathog* 3(4): 541-552
64. **Theil E. (2004).** Iron, ferritin, and nutrition. *Annu Rev Nutr* 24:327-324
65. **Theurl I., Theurl M., Seifert M., Mair S., Nairz M., Rumpold H., Zoller H., y col (2008).** Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood* 111 (4) : 2392-2399
66. **Thompson K., Molina R., Brain J., Wessling-Resnick M. (2006).** Belgrade Rats Display Liver Iron Loading. *J Nutr* 136 (12): 3010-3014
67. **Trinder D., Fox C., Vautier G., Olynyk J.K. (2002).** Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut* 51:290-295
68. **Truksa J., Lee P., Peng H., Flanagan J, Beutler E. (2007a).** The distal location of the iron responsive region of the hepcidin promoter. *Blood* 110(9):3436-3537
69. **Truksa J., Peng H., Lee P., Beutler E. (2007b).** Different regulatory elements are required for response of hepcidin to IL-6 and bone morphogenetic proteins BMP 4 and 9. *Br J Haematol* 139:138-147.
70. **Wallace D.F., Jones M.D., Pedersen P., Rivas L., Sly L.I., Subramaniam N.V. (2006).** Purification and partial characterisation of recombinant human hepcidin. *Biochimie* 88: 31-37

71. Wang R.H., Li C., Xu X., Zheng Y., Xiao C., Zerfas P., Cooperman S., Eckhaus M., Rouault T., Mishra L., Deng C. (2005). A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell. Metab.* 2:399-409
72. Wrighting D. y Andrews N. (2006). Interleukin-6 induces hepcidin expresión through STAT3. *Blood* 108(9): 3204-3209
73. Youdim M.B. y Riederer P. (1993). The role of iron in senescence of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 40:57-67.
74. Zhang J., Stanton D.M., Nguyen X.V., Liu M., Zhang Z., Gash D., Bing G. (2005). Intrapallidal lipopolysaccharide injection increases iron and ferritin levels in glia of the rat substantia nigra and induces locomotor deficits. *Neuroscience* 135(3):829-838.
75. Zechel S., Huber-Wittmer K., von Bohlen, Halbach O. (2006). Distribution of the iron-regulating protein Hepcidin in the murine central nervous system. *J Neurosci Res* 84: 790-800