



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,
BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

**EFFECTO DEL CALCIO SOBRE EL MOVIMIENTO
DE DMT1 Y FPN1 DURANTE LA CAPTACIÓN
DE HIERRO NO HEMO EN CÉLULAS CACO-2**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA, MENCIÓN
INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

LAYIMAR COROMOTO CEGARRA ALVARADO

PROFESOR GUÍA:
JOSÉ CRISTIAN SALGADO HERRERA

PROFESORA CO-GUÍA:
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE
IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA
CARLOS CONCA ROSENDE
MARCO NUÑEZ GONZÁLEZ
DANIEL BÓRQUEZ MACHERONE

Este trabajo ha sido financiado por ANID, Programa de
Doctorado Nacional 2017, Beca N° 21170027

SANTIAGO DE CHILE
2023

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA, MENCIÓN INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA
POR: LAYIMAR COROMOTO CEGARRA ALVARADO
FECHA: 2023
PROFESOR GUÍA: JOSÉ CRISTIAN SALGADO HERRERA

EFFECTO DEL CALCIO SOBRE EL MOVIMIENTO DE DMT1 Y FPN1 DURANTE LA CAPTACIÓN DE HIERRO NO HEMO EN CÉLULAS CACO-2

El hierro y el calcio son micronutrientes esenciales para el crecimiento y normal desarrollo de los seres humanos. El hierro es un componente esencial para el desarrollo de los procesos celulares, debido a su capacidad de ciclar entre los estados de oxidación ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}). Sin embargo, su sobrecarga o deficiencia está relacionada con diversas enfermedades, por lo que mantener su homeostasis corporal es fundamental. Los humanos no poseen un mecanismo regulado para la excreción de hierro; por ello, su absorción es un proceso celular altamente regulado. El hierro no hemo dietético, Fe^{3+} , primero es reducido a Fe^{2+} para luego ser absorbido desde la membrana de ribete de cepillo intestinal por el Transportador de Metal Divalente 1 (DMT1). Después de entrar en el enterocito, Fe^{2+} pasa a formar parte del grupo de hierro lábil citosólico (cLIP) y, según los requisitos sistémicos del organismo, puede luego transferirse al torrente sanguíneo desde la membrana basolateral mediante ferroportina (FPN). Se ha propuesto que altas concentraciones de calcio en la dieta podrían reducir la biodisponibilidad del hierro; sin embargo, se desconocen las dosis de calcio y los mecanismos por los que el calcio podría ejercer un efecto inhibitorio sobre la absorción de hierro.

En este trabajo se investigó el efecto del calcio en la captación de hierro no hemo de las células epiteliales cancerígenas provenientes del adenocarcinoma de colon humano Caco-2. Se mostró que el calcio extracelular inhibe la captación de hierro por las células Caco-2 de una manera dependiente de la concentración y que su efecto inhibitorio no se ejerce a través de la señalización del calcio intracelular, ya que la quelación del calcio intracelular con BAPTA no afectó la captación de hierro. Además, se determinó que el calcio actúa como un inhibidor reversible no competitivo del transporte de hierro mediado por DMT1. Se desarrolló un modelo matemático utilizando un mecanismo de cuatro estados para describir la inhibición no competitiva del calcio sobre el transporte de hierro mediado por DMT1 en las células Caco-2 con el cual se predijo con precisión la dinámica de extinción de la fluorescencia de calceína observada experimentalmente.

Utilizando células Caco-2 polarizadas cultivadas en insertos bicamerales como modelo de epitelio intestinal, se mostró que el calcio extracelular modifica la ubicación de DMT1, ya que mientras mayor fue la concentración de calcio, mayor fue la reubicación de DMT1 en los dominios basales; en cambio, al reducir al mínimo la concentración de calcio, la concentración apical de DMT1 aumentó de manera significativa; por otro lado, cuando las células se expusieron a hierro, se indujo una relocalización de DMT1 a los compartimientos intracelulares, pero esta relocalización fue más rápida cuando la concentración de Ca^{2+} extracelular era de $10 \mu\text{M}$ en comparación con la obtenida en presencia de 3 mM . Además, se evidenció que los cambios en la localización de FPN inducidos por las concentraciones de calcio extracelular no fueron estadísticamente significativos. Estos resultados muestran por primera vez que el ciclo endocítico de DMT1 en las células Caco-2 está determinado por la concentración de hierro y de calcio en el compartimiento apical. Los hallazgos obtenidos sugieren nuevamente que el calcio inhibe de manera no competitiva la captación de hierro mediada por DMT1 en células Caco-2, ya que, según la concentración de calcio extracelular no sólo la ubicación de este transportador en la célula se ve alterada, sino también su capacidad de transporte de hierro.

Se propusieron tres modelos fenomenológicos para describir el movimiento de DMT1 en las células Caco-2 asociado a los cambios en la concentración de calcio extracelular en el medio apical y al proceso de captación de hierro no hemo. Los modelos A y B no lograron representar adecuadamente la dinámica de DMT1 en la membrana apical. El *modelo C* acopla dos osciladores de Ball para representar el comportamiento oscilatorio de la internalización de DMT1 cuando está o no unida a Ca^{2+} , e incorpora un estado de DMT1 en la membrana apical que representa la fracción de DMT1 unida tanto a hierro como a calcio. Los parámetros obtenidos del ajuste para el *modelo C* son positivos y se identificaron como significativos para todos los casos. El *modelo C* propuesto reprodujo cualitativa y cuantitativamente las principales características de la variación de la concentración de DMT1 en la membrana apical observada luego de modificar la concentración de calcio en el compartimiento apical de los insertos de las células Caco-2, con o sin la presencia de $10 \mu\text{M}$ de FAS.

Con base en los resultados generados y considerando que la ingesta dietética recomendada por el Instituto de Medicina de EE. UU. de hierro (18 mg/día) y calcio (1000 mg/día), equivalen en el sistema experimental a $10 \mu\text{M}$ de FAS y $1,5 \text{ mM}$ de CaCl_2 , es posible especular que, si se toman los suplementos de estos metales juntos, el suplemento de calcio podría afectar negativamente la captación intestinal de hierro. Por lo tanto, debería ser recomendable que estos dos suplementos pudieran tomarse en diferentes momentos.

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo de Chile (ANID) que me otorgo una beca para poder realizar mis estudios de doctorado. Al Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB), por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo. Al Laboratorio de Hierro y Biología del Envejecimiento de Facultad de Ciencias, por su invaluable apoyo para realizar los experimentos de esta investigación.

A la Profesora Ziomara P. Gerdtzen y al Profesor J. Cristian Salgado, por su apoyo académico y personal desde el primer día del inicio del doctorado. Sin su valiosa dirección y ayuda incondicional jamás habría sido posible lograr esta meta.

Al Profesor Marco T. Nuñez y a Pabla Aguirre, su guía en el trascurso de mi investigación fue exactamente la que necesitaba para llevarla por el camino correcto.

A todos los Profesores del Departamento de Ingeniería Química, Biotecnología y Materiales, por su vocación y su buena disposición para ayudar a todos los estudiantes.

A mis padres, porque a pesar de la distancia su apoyo continuo me dio las fuerzas necesarias para continuar. A mi hermana, por motivarme y apoyarme en el final de este trabajo.

A mi amigo Renny Márquez, quien me brindó un techo y una mano amiga durante mis primeros días en Chile. Gracias.

A mi Jesús Manuel, aunque perderte en la mitad de este proyecto sin podernos despedir será el más inmenso dolor de mi vida, sé que desde donde estés celebras conmigo la culminación de esta investigación. Te amo por siempre.

Tabla de Contenido

Capítulo 1. Introducción General	1
1.1 El hierro	1
1.2 Proceso de absorción intestinal del hierro	3
1.2.1 Transportador de Metal Divalente 1 (DMT1)	5
1.2.2 Ferroportina (FPN)	8
1.2.3 Ferritina	10
1.2.4 Transferrina (Tf) y Receptores de Transferrina (RTf)	10
1.3 Mecanismos de regulación de la absorción de hierro	12
1.3.1 Regulación sistémica	12
1.3.2 Regulación transcripcional	13
1.3.3 Regulación traduccional	14
1.3.4 Bloqueo de la mucosa	15
1.4 Potenciadores e inhibidores dietéticos del proceso de absorción de hierro	16
1.4.1 Potenciadores dietéticos del proceso de absorción de hierro	16
1.4.2 Inhibidores dietéticos del proceso de absorción de hierro	19
1.5 El Calcio en la absorción de Hierro	21
1.6 Modelos Matemáticos	30
1.6.1 Modelos Biológicos	30
1.6.1.1 Modelos de estados para representar el transporte mediado por proteínas	30
1.6.1.2 Modelos biológicos oscilatorios	31
1.6.2 Modelos Matemáticos del Sistema de Absorción de Hierro	33
1.6.2.1 Modelos basados en el metabolismo del hierro a nivel sistémico	33
1.6.2.2 Modelos basados en el metabolismo del hierro a nivel celular	36
1.7 Línea Celular Caco-2	40
1.8 Objetivos	42
1.8.1 Objetivo general	42
1.8.2 Objetivos específicos	43
1.8 Resumen de los principales resultados	43
Capítulo 2. Efecto del calcio extracelular en el estado del hierro lábil citosólico de las células Caco-2, cuando estas se someten a un desafío de hierro no hemo	
2.1 Introducción	47
2.2 Materiales y Métodos	48
2.2.1 Cultivo de células	48
2.2.2 Fuente de hierro	49
2.2.3 Fuente de calcio	50
2.2.4 Entrada de hierro en el grupo de hierro lábil citoplasmático	51
2.2.5 Entrada de hierro en el grupo de hierro lábil citosólico después de la quelación del calcio intracelular	52
2.2.6 Capacidad amortiguadora de BAPTA después de la elevación de la concentración de calcio citosólico con Tapsigargina	53
2.2.7 Entrada de hierro en grupo de hierro lábil citosólico después de la preincubación con calcio	54
2.2.8 Análisis estadístico	54
2.3 Resultados y Discusión	55

2.3.1 Inhibición de la entrada de hierro grupo de hierro lábil citosólico (cLIP) por el calcio	55
2.3.2 Efecto de BAPTA y Tapsigargina en la concentración de Ca^{2+} intracelular ..	56
2.3.3 El calcio es un inhibidor reversible de la captación de hierro	58
2.3.4 Modelamiento matemático del efecto inhibitor del calcio a través del decaimiento de la fluorescencia de la calceína	59
2.4 Conclusión	67
Capítulo 3: Caracterización experimental de la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN en las células Caco-2, inducida por la presencia o ausencia en el medio extracelular de hierro no hemo y/o calcio	
3.1 Introducción	69
3.2 Materiales y Métodos	72
3.2.1 Cultivo de células	72
3.2.2 Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER)	72
3.2.3 Minipreparación de ADN plasmídico de DMT1-1A/IRE(+) y FPN1	72
3.2.4 Transfección transitoria en las células Caco-2	74
3.2.5 Lectura de la fluorescencia de DMT1-EGFP y FPN-TagRFP	77
3.2.6 Corrección del fotoblanqueo de los valores de fluorescencia de DMT1 y de FPN	78
3.2.7 Perfiles de distribución de DMT1 y de FPN	81
3.3 Resultados y Discusión	82
3.3.1 Efecto del calcio extracelular en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN	82
3.3.1.1 Análisis del efecto del calcio extracelular en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, cuando el medio tiene una concentración de 10 μM de CaCl_2	100
3.3.1.2 Análisis del efecto del calcio extracelular en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, cuando el medio tiene una concentración de 1,5 mM de CaCl_2	101
3.3.1.3 Análisis del efecto del calcio extracelular en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, cuando el medio tiene una concentración de 3 mM de CaCl_2	102
3.3.2 Efecto del calcio extracelular en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, cuando las células se desafían con 10 μM de FAS	103
3.3.2.1 Análisis del efecto de un desafío de 10 μM de FAS en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, realizado cuando el medio del cultivo tiene una concentración final de calcio de 10 μM de CaCl_2	106
3.3.2.2 Análisis del efecto de un desafío de 10 μM de FAS en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, realizado cuando el medio del cultivo tiene una concentración final de calcio de 1,5 mM de CaCl_2	121
3.3.2.3 Análisis del efecto de un desafío de 10 μM de FAS en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, realizado cuando el medio del cultivo tiene una concentración final de calcio de 3 mM de CaCl_2	122
3.4 Conclusión	124
Capítulo 4: Planteamiento de un modelado matemático para describir el movimiento de DMT1 en la membrana apical de las células Caco-2 debido al efecto inhibitorio del calcio sobre el proceso de captación de hierro no hemo	

4.1 Introducción	128
4.2 Materiales y Métodos	129
4.2.1 Solución del problema inverso	129
4.2.2 Detalles de la simulación	131
4.2.3 Consideraciones para la construcción del Modelo Fenomenológico	131
4.3 Construcción del Modelo fenomenológico	132
4.3.1 Modelo A	132
4.3.2 Modelo B	139
4.3.3 Modelo C	142
4.4 Conclusiones	151
Capítulo 5: Conclusiones Generales	155
Bibliografía	158
Anexos	192
Glosario	217

Índice de Figuras

- 1.1. Principales componentes del proceso de absorción de hierro. Adaptada de [Cegarra y col. \(2019\)](#) 4
- 1.2. Cinética de internalización de DMT1-1A/IRE(+) inducida por el desafío de $20 \mu M$ de Fe-NTA, sulfato de amonio ferroso (FAS) o ascorbato ferroso (Fe-Asc). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Tomada de [Esparza y col. \(2015\)](#) 16
- 1.3. Efecto de la alimentación con $20 mg$ de $FeSO_4$ sobre la localización en el intestino de rata de los transportadores DMT1 y FPN1. **A)** DMT1 (rojo), **B)** FPN1 (verde). El efecto en la relocalización celular se observó luego de 3,5 horas de la alimentación con hierro. Tomada de [Núñez, \(2010\)](#) 16
- 1.4. Diagramas de estados de proteínas transportadoras de membrana: **(A)** Uniportadoras; **(B)** Simportadoras; **(C)** Antiportadoras. Tomada de ([Sproles, 2017](#)) 31
- 1.5. Diagrama de estados del modelo oscilatorio de Ball 33
- 1.6. *Diagrama de bloques del modelo para el metabolismo del hierro.* Los bloques de contorno delgado representan depósitos de hierro, mientras que los de contorno grueso representan el mecanismo de control de la eritropoyesis. Las flechas finas representan flujos de hierro o eritropoyetina, mientras que las grandes son las señales de entrada-salida del mecanismo de control. Tomado de [Colli y col. \(1982\)](#) 33
- 1.7. Modelo de 8 compartimentos de la absorción de hierro y cinética de hierro en plasma. Tomada de [Nathanson y col. \(1984\)](#) 34
- 1.8. Diagrama del modelo compartimental. Tomada de [Lao y Kamei \(2006\)](#) 35
- 1.9. Esquema del modelo que incluye los grupos de hierro, los flujos de hierro y la regulación de los niveles sistémicos de hierro por el sistema regulador de hepcidina/ferroportina. Tomado de [Enculescu y col. \(2017\)](#) 36
- 1.10. Modelo cinético de DMT1. Tomada de [Mackenzie y col. \(2005\)](#) 36
- 1.11. **Mecanismo propuesto para la captación/liberación de hierro por ferritina.** **(A)** El hierro (Fe) ingresa a través de un poro en la estructura de jaula de la proteína apoferritina ($Fn_{(0)}$), formando un complejo de hierro-ferritina ($FeFn_0$) a través de un proceso reversible. **(B)** Una serie de reacciones redox conducen la incorporación de hierro en el núcleo mineral de la ferritina ($Fn_{(1)}$). Después de n pasos de incorporación, se obtiene la especie de ferritina $Fn_{(n)}$. **(C)** El hierro se puede liberar desde el núcleo mineral a través de procesos redox y de transporte. **(D)** Las moléculas de ferritina también pueden degradarse proteolíticamente, devolviendo todo su contenido de hierro al cLIP durante este proceso. Tomada de [Salgado y col. \(2010\)](#)...37
- 1.12. *Datos experimentales y simulación del modelo de [Colins y col. \(2017\)](#).* Simulación del modelo (curvas) y datos experimentales (círculos) de la captación apical de hierro después de un desafío de $5 \mu M$ (círculos azules), $10 \mu M$ (círculos verdes) o $20 \mu M$ (círculos rojos) de hierro en el medio apical de las células Caco-2. Los círculos corresponden al valor promedio de la muestra y las barras de error indican su desviación estándar. Tomado de [Colins y col. \(2017\)](#) 39
- 1.13 **DMT1 swinging-mechanism model.** DMT1 vacío (P_1) está orientado hacia el lado apical donde puede unirse a Fe^{2+} (P_2), entonces sufre un cambio conformacional (P_3), libera hierro al medio intracelular (P_4) y vuelve a su estado original (P_1). DMT1 en el estado P_4 puede ser endocitada en vesículas que contienen hierro (P_5), donde puede cambiar a un estado capaz de liberar hierro de la vesícula al cLIP (P_6). (círculo

- naranja): concentración de hierro apical (Fe_{OUT}^{2+}). (círculo marrón): concentración de hierro en el espacio intracelular-basolateral (Fe_{IN}^{2+}). Las reacciones autocatalíticas de los estados P_4 , P_5 y P_6 están representadas por una flecha moduladora discontinua circular. El hierro extracelular se considera un factor regulador en la endocitosis, representado como una flecha moduladora discontinua. Tomada de [Cegarra y col. \(2019\)](#) 39
- 1.14. Simulación del DMT1 swinging-mechanism model. a:** Captación de hierro apical después del primer (0-15 min) y segundo (15-30 min) desafío de hierro. (○): el valor promedio de la muestra y las barras de error indican su desviación estándar; (—): simulación de modelo. **b:** Simulación del comportamiento del ciclo endocítico DMT1 durante la absorción de hierro para el primer (0-15 min) y segundo (15-30 min) desafío de hierro. (línea naranja): fracción de DMT1 en la membrana apical ($P_1 + P_2 + P_3 + P_4$); (línea azul): fracción de DMT1 en estado endocitado ($P_5 + P_6$). Tomada de [Cegarra y col. \(2019\)](#) 40
- 2.1. Registros de fluorescencia de extinción de calceína inducida por 10 μM de FAS, cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μM (líneas moradas, \blacktriangle y \blacklozenge), 1,5 mM (líneas azules, \blacksquare y \blacktriangleleft) o 3 mM (líneas verdes, \bullet y \blacktriangleright) de Ca^{2+} .** La carga de calceína se realizó en MEM sin rojo fenol, reduciendo la concentración de este medio a 10 μM de $CaCl_2$ con EGTA. Los valores se expresan como $F-F_0$, donde F es la medida de la fluorescencia y F_0 es la media de la fluorescencia de referencia antes de la exposición al hierro. **(A) Conjunto de entrenamiento:** mediciones realizadas cada 33,6 segundos. Los resultados experimentales se presentan como *media \pm D.E.* de 12 pocillos. **(B) Conjunto de prueba:** mediciones realizadas cada 25,3 segundos. Los resultados experimentales se presentan como *media \pm D.E.* de 8 pocillos 55
- 2.2. Efecto de 5 μM de TAP en la concentración de calcio intracelular, cuando la sonda Fluo-3 se carga en células Caco-2 en presencia o ausencia de BAPTA-AM 20 μM .** Después de cargar Fluo-3, se agregó MEM con **(A)** 10 μM , **(B)** 1,5 mM, o **(C)** 3 mM de Ca^{2+} . Se registró una línea de base durante 5 minutos, y luego se aplicó TAP a las células cargadas (rojo violeta \blacklozenge) o no (verde \bullet) con BAPTA-AM. Los grupos de control son pocillos con células cargadas con Fluo-3, con (azul \blacktriangle) o sin (naranja \blacklozenge) BAPTA-AM, en los que no se añade TAP. Los datos se expresan como F/F_0 , valores de fluorescencia en un momento determinado (F) divididos por la media de las primeras cuatro mediciones de fluorescencia de referencia (F_0). Los resultados experimentales se presentan como *media \pm D.E.* de 4 pocillos. Se añadió TAP en los tiempos indicados por la flecha. Las mediciones de fluorescencia se obtuvieron en un lector de placas Synergy 2 (BioTek®) 57
- 2.3. El calcio es un inhibidor reversible de la captación de hierro.** Las células Caco-2 se preincubaron durante 10 minutos con 10 μM (morado claro \blacktriangle), 1,5 mM (azul \times) o 3 mM (verde oscuro \bullet) de Ca^{2+} , y luego se lavaron con PBS (x2) y se incubaron en un medio con 10 μM de $CaCl_2$ durante 10 minutos antes de comenzar la medición de fluorescencia de referencia durante 3 minutos, seguido de la adición de 10 μM de FAS. Se incluyeron experimentos de control positivo y negativo. En el control positivo (pc), las células se incubaron con 1,5 mM (azul claro $*$) o 3 mM (verde \blacklozenge) de $CaCl_2$, y en el control negativo (nc) con 10 μM $CaCl_2^+$ (morado \blacktriangledown). Los resultados experimentales se presentan como *media \pm D.E.* de 4 pocillos, y para cada control se

- presentan como *media* \pm *D.E.* de 2 pocillos. Las mediciones de fluorescencia se obtuvieron en un lector de placas Synergy 2 (BioTek®) 59
- 2.4. Modelo propuesto para la inhibición reversible no competitiva de DMT1 por calcio.** El calcio se une al complejo DMT1 y DMT1-Fe. El complejo DMT1-Fe-Ca no puede transportar hierro al interior de la célula. DMT1 vacío (P_1) puede unirse a Fe_{OUT}^{2+} ($P_1 \rightarrow P_2$) y luego a Ca_{OUT}^{2+} ($P_2 \rightarrow P_4$), o puede unirse a Ca_{OUT}^{2+} ($P_1 \rightarrow P_3$) y luego a Fe_{OUT}^{2+} ($P_3 \rightarrow P_4$). DMT1 unido solo a Fe_{OUT}^{2+} (P_2) libera hierro al medio intracelular y vuelve a su estado original ($P_2 \rightarrow P_1$). (Círculo naranja): concentración de hierro extracelular (Fe_{OUT}^{2+}); (círculo marrón): concentración de hierro en el espacio intracelular (Fe_{IN}^{2+}); (cuadrado morado): concentración de calcio extracelular (Ca_{OUT}^{2+}); (ovalito azul): DMT1 60
- 2.5. Simulación de la inhibición reversible no competitiva de DMT1 por calcio, después la adición de 10 μ M de FAS, cuando la concentración de calcio extracelular era 10 μ M, 1,5 mM o 3 mM de Ca^{2+} .** (•): media de las observaciones experimentales, con y sin BAPTA-AM; (–): simulación de modelo. (A) Decaimiento de la fluorescencia de la calceína para el conjunto de entrenamiento. Los resultados experimentales se presentan como *media* \pm *D.E.* de 24 pocillos. (B) Decaimiento de la fluorescencia de la calceína para el conjunto de prueba. Los resultados experimentales se presentan como *media* \pm *D.E.* de 16 pocillos 65
- 2.6. Simulación de los estados de DMT1 durante la captación de hierro para cada concentración de calcio extracelular estudiada.** Fracciones de DMT1 con (A) 10 μ M, (B) 1,5 mM, o (C) 3 mM de Ca^{2+} 66
- 3.1.** Protocolo resumido para *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0502#/K0502> 73
- 3.2. Selección del área correspondiente a la célula Caco-2 #1 analizada cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μ M, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos).** La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 84
- 3.3. Relocalización en el tiempo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 10 μ M de $CaCl_2$.** Eje “Cortes en el eje Basal a Apical” es el número de cortes ópticos de cada célula, donde “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje, y la suma de la intensidad de fluorescencia de todos los cortes para cada instante de tiempo es 1 89
- 3.4. Relocalización en el tiempo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 1,5 mM de $CaCl_2$.** En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje 90
- 3.5. Relocalización en el tiempo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 3 mM de $CaCl_2$.** En el eje

- “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje 91
- 3.6.** Relocalización en el tiempo de FPN-Tag-RFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 10 μM de CaCl_2 . En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje 92
- 3.7.** Relocalización en el tiempo de FPN-Tag-RFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 1,5 mM de CaCl_2 . En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje 93
- 3.8.** Relocalización en el tiempo de FPN-Tag-RFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 3 mM de CaCl_2 . En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje 94
- 3.9.** Perfil distribución de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal en el tiempo inicial, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 , (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 95
- 3.10.** Perfil distribución de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal capturado para el instante de tiempo inmediatamente posterior a la adición del medio con la concentración de calcio a analizar, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 , (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 95
- 3.11.** Perfil distribución de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal capturado en ~24 minutos, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 , (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 96
- 3.12.** Perfil distribución de FPN-TagRFP entre los dominios apical–basal en el tiempo inicial, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 , (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 96
- 3.13.** Perfil distribución de FPN-TagRFP entre los dominios apical–basal capturado para el instante de tiempo inmediatamente posterior a la adición del medio con la concentración de calcio a analizar, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 , (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 97
- 3.14.** Perfil distribución de FPN-TagRFP entre los dominios apical–basal capturado en ~24 minutos, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 , (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 97
- 3.15.** Fracción de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP en la membrana apical, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 , * $p < 0,05$ (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 . Los resultados experimentales se presentan como las medias \pm D.E. de 7 células 98

- 3.16.** Fracción de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP en la membrana basal, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 , * $p < 0,05$ (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 . Los resultados experimentales se presentan como las medias \pm D.E. de 7 células 98
- 3.17.** Fracción de FPN-TagRFP en la membrana apical, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 , (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 . Los resultados experimentales se presentan como las medias \pm D.E. de 7 células 99
- 3.18.** Fracción de FPN-TagRFP en la membrana basal, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 , (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 . Los resultados experimentales se presentan como las medias \pm D.E. de 7 células 99
- 3.19.** Selección del área correspondiente a la célula Caco-2 # 1 analizada cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μM , y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 105
- 3.20.** Relocalización en el tiempo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 10 μM de CaCl_2 y 10 μM de FAS. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje 110
- 3.21.** Relocalización en el tiempo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 1,5 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje 111
- 3.22.** Relocalización en el tiempo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 3 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje 112
- 3.23.** Relocalización en el tiempo de FPN-Tag-RFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 10 μM de CaCl_2 y 10 μM de FAS. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje 113
- 3.24.** Relocalización en el tiempo de FPN-Tag-RFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 1,5 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje 114

- 3.25.** Relocalización en el tiempo de FPN-Tag-RFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 3 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje 115
- 3.26.** Perfil distribución de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal en el tiempo inicial, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, y (C) 3 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS 116
- 3.27.** Perfil distribución de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal capturado para el instante de tiempo inmediatamente posterior a la adición del medio con la concentración de calcio a analizar, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, y (C) 3 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS 116
- 3.28.** Perfil distribución de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal capturado en ~24 minutos, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, y (C) 3 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS 117
- 3.29.** Perfil distribución de FPN-TagRFP entre los dominios apical–basal en el tiempo inicial, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, y (C) 3 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS 117
- 3.30.** Perfil distribución de FPN-TagRFP entre los dominios apical–basal capturado para el instante de tiempo inmediatamente posterior a la adición del medio con la concentración de calcio a analizar, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, y (C) 3 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS 118
- 3.31.** Perfil distribución de FPN-TagRFP entre los dominios apical–basal capturado en ~24 minutos, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, y (C) 3 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS 118
- 3.32.** Fracción de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP en la membrana apical, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, y (C) 3 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS. Los resultados experimentales se presentan como las medias ± D.E. de 6 células 119
- 3.33.** Fracción de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP en la membrana basal, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, y (C) 3 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS. Los resultados experimentales se presentan como las medias ± D.E. de 6 células 119
- 3.34.** Fracción de FPN-TagRFP en la membrana apical, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, y (C) 3 mM de CaCl₂ y 10 μM de FAS. Los resultados experimentales se presentan como las medias ± D.E. de 6 células 120
- 3.35.** Fracción de FPN-TagRFP en la membrana basal, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl₂ y 10 μM de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10

- μM de FAS, y (C) 3 mM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS. Los resultados experimentales se presentan como las medias \pm D.E. de 6 células 120
- 4.1. Modelo A.** DMT1 en la membrana apical no unida a hierro ni a calcio y orientada hacia el lado apical (P_1), puede unirse al calcio del medio extracelular cambiando su conformación a un estado donde no puede transportar hierro (P_7), desde donde DMT1 puede ser endocitado en vesículas permaneciendo en un estado es incapaz de liberar hierro al citosol (P_8). Circulo naranja: concentración de hierro extracelular (Fe_{OUT}^{2+}); circulo marrón: concentración de hierro en el espacio intracelular-basolateral (Fe_{IN}^{2+}); circulo gris: concentración de calcio extracelular (Ca_{OUT}^{2+}). El hierro y el calcio extracelular se consideran factores reguladores en la endocitosis, representados como una flecha moduladora discontinua ($--\bullet$). Las reacciones autocatalíticas de los estados P_4 , P_5 y P_6 están representadas por una flecha moduladora circular discontinua ($\rightarrow\rightarrow$) 133
- 4.2. Simulación del Modelo A.** Simulación del modelo (curvas negras) y datos experimentales (* rosados) de la fracción de DMT1 en la membrana apical ($P_1 + P_2 + P_3 + P_4 + P_7$) después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por: (A) 10 μM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (B) 1,5 mM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (C) 3 mM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (D) 10 μM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS, (E) 1,5 mM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS, (F) 3 mM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS. Los asteriscos corresponden al valor promedio de las muestras del conjunto de entrenamiento y las barras de error indican su desviación estándar 138
- 4.3. Modelo B.** DMT1 en la membrana apical no unida a hierro ni a calcio y orientada hacia el lado apical (P_1), puede unirse al calcio del medio extracelular cambiando su conformación a un estado donde no puede transportar hierro (P_7), y DMT1 unido a calcio puede ser endocitado en vesículas (P_8), desde donde podrá cambiar su conformación para retornar a la membrana (P_9). Circulo naranja: concentración de hierro extracelular (Fe_{OUT}^{2+}); circulo marrón: concentración de hierro en el espacio intracelular-basolateral (Fe_{IN}^{2+}); circulo gris: concentración de calcio extracelular (Ca_{OUT}^{2+}). El hierro y el calcio extracelular se consideran factores reguladores en la endocitosis, representados como una flecha moduladora discontinua ($--\bullet$). Las reacciones autocatalíticas de los estados P_4 , P_5 y P_6 , y P_7 , P_8 y P_9 están representadas por una flecha moduladora circular discontinua ($\rightarrow\rightarrow$) 139
- 4.4. Simulación del Modelo B.** Simulación del modelo (curvas negras) y datos experimentales (* rosados) de la fracción de DMT1 en la membrana apical ($P_1 + P_2 + P_3 + P_4 + P_7$) después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por: (A) 10 μM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (B) 1,5 mM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (C) 3 mM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (D) 10 μM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS, (E) 1,5 mM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS, (F) 3 mM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS. Los asteriscos corresponden al valor promedio de las muestras del conjunto de entrenamiento y las barras de error indican su desviación estándar 141
- 4.5. Modelo C.** DMT1 en la membrana apical vacío y orientado hacia el lado apical (P_1), puede unirse al calcio del medio apical (P_7) y posteriormente al hierro de este medio (P_{10}), o unirse primero al hierro del medio apical (P_2) y posteriormente al hierro de este medio (P_{10}), donde DMT1 unido a calcio, teniendo o no unido hierro, no podrá transportar hierro. Circulo naranja: concentración de hierro extracelular (Fe_{OUT}^{2+}); circulo marrón: concentración de hierro en el espacio intracelular-basolateral (Fe_{IN}^{2+});

circulo gris: concentración de calcio extracelular (Ca_{OUT}^{2+}). El hierro y el calcio extracelular se consideran factores reguladores en la endocitosis, representados como una flecha moduladora discontinua (--●). Las reacciones autocatalíticas de los estados P_4 , P_5 y P_6 , y P_7 , P_8 y P_9 están representadas por una flecha moduladora circular discontinua (→)	144
4.6. Simulación del Modelo C para el conjunto de entrenamiento. Simulación del modelo (curvas negras) y datos experimentales del conjunto de entrenamiento (* rosados) de la fracción de DMT1 en la membrana apical después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por: (A) 10 μM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (B) 1,5 mM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (C) 3 mM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (D) 10 μM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS, (E) 1,5 mM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS, (F) 3 mM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS. Los asteriscos corresponden al valor promedio de las muestras del conjunto de entrenamiento y las barras de error indican su desviación estándar	145
4.7. Simulación del Modelo C para el conjunto de validación. Simulación del modelo (curvas negras) y datos experimentales del conjunto de validación (* rosados) de la fracción de DMT1 en la membrana apical después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por: (A) 10 μM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (B) 1,5 mM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (C) 3 mM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (D) 10 μM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS, (E) 1,5 mM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS, (F) 3 mM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS. Los asteriscos corresponden al valor promedio de las muestras del conjunto de entrenamiento y las barras de error indican su desviación estándar	146
4.8. Simulación de la variación de calcio extracelular en el medio apical predicha por el Modelo C para el conjunto de validación. Simulación del modelo (curvas negras) para variación de la concentración de Ca^{2+} en el compartimiento apical de las células Caco-2, después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por: (A) 10 μM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (B) 1,5 mM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (C) 3 mM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (D) 10 μM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS, (E) 1,5 mM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS, (F) 3 mM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS	148
4.9. Simulación de la captación de hierro predicha por el Modelo C para el conjunto de validación. Simulación del modelo (curvas negras) para la captación de Fe^{2+} de las células Caco-2, después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por: (A) 10 μM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (B) 1,5 mM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (C) 3 mM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, (D) 10 μM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS, (E) 1,5 mM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS, (F) 3 mM de $CaCl_2$ y 10 μM de FAS	149
4.10. Simulación del Modelo C con restricciones. Simulación del modelo (curvas negras) y datos experimentales del conjunto de validación (* rosados) de la fracción de DMT1 en la membrana apical después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por 3 mM de $CaCl_2$ y 0 μM de FAS, para: (A) el conjunto de entrenamiento, (B) el conjunto de validación. Los asteriscos corresponden al valor promedio de las muestras del conjunto de entrenamiento y las barras de error indican su desviación estándar	151
A1. Composición del medio MEM sin rojo fenol	192

- A2.** Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #1 y (B) #2 y #3, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μ M, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 196
- A3.** Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #4 y #5 y (B) #6 y #7, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μ M, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 197
- A4.** Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #1 y #2 y (B) #3, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 198
- A5.** Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #4 y #5 y (B) #3, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 199
- A6.** Selección del área correspondiente a la célula Caco-2 #7, analizada cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 200
- A7.** Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #1, #2 y #3 y (B) #4, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 201
- A8.** Selección del área correspondiente a la célula Caco-2 #5, #6 y #7, analizada cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 202
- A9.** Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #1 y (B) #2, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μ M junto con 10 μ M de FAS, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de

- DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 203
- A10.** Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #3 y #4 y (B) #5 y #6, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μ M junto con 10 μ M de FAS, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 204
- A11.** Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #1 y #2, y (B) #3, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM junto con 10 μ M de FAS, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 205
- A12.** Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #4, y (B) #5 y #6, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM junto con 10 μ M de FAS, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 206
- A13.** Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #1 y #2, y (B) #3 y #4, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM junto con 10 μ M de FAS, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 207
- A14.** Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #5, y (B) #6, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM junto con 10 μ M de FAS, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS) 208
- A15.** Mapa circular del vector de expresión pEGFP-C1. El gen SLC11A2-1A/IRE(+) se subclonó en este vector. Disponible en: <https://www.addgene.org/44225/>..... 209
- A16.** Mapa circular del vector de expresión pTagRFP-C. El gen SLC40A1 se subclonó en este vector. Disponible en <http://evrogen.com/products/vectors/pTagRFP-C/pTagRFP-C.shtml> 209

Índice de Tablas

1.1. Características del cultivo de células Caco-2	42
2.1. Modelos lineales del decaimiento de la fluorescencia de la calceína debido a un desafío de hierro ($10 \mu M$ de FAS). Estos modelos se ajustan a los dos primeros datos de fluorescencia después de agregar FAS. f representa la fluorescencia de la calceína ($F - F0$) y t es el tiempo en minutos	56
2.2. Parámetros del modelo de inhibición reversible no competitiva de DMT1 por calcio..	64
3.1. Características de la visualización de las proteínas DMT1-EGFP y FPN1-TagRFP en cada célula Caco-2, utilizando microscopial confocal, cuando la concentración de calcio extracelular era de $10 \mu M$	82
3.2. Características de la visualización de las proteínas DMT1-EGFP y FPN1-TagRFP en cada célula Caco-2, utilizando microscopial confocal, cuando la concentración de calcio extracelular era de $1,5 mM$	83
3.3. Características de la visualización de las proteínas DMT1-EGFP y FPN1-TagRFP en cada célula Caco-2, utilizando microscopial confocal, cuando la concentración de calcio extracelular era de $3 mM$	83
3.4. Curvas multi-exponenciales que predicen el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP para cada célula Caco-2 estudiada, cuando la concentración de calcio extracelular era de $10 \mu M$	86
3.5. Curvas multi-exponenciales que predicen el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP para cada célula Caco-2 estudiada, cuando la concentración de calcio extracelular era de $1,5 mM$	87
3.6. Curvas multi-exponenciales que predicen el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP para cada célula Caco-2 estudiada, cuando la concentración de calcio extracelular era de $3 mM$	88
3.7. Modelos lineales de la internalización de DMT1 desde la membrana apical, debida a un cambio de la concentración de Ca^{2+} extracelular. Estos modelos se ajustan a los dos primeros datos de la fracción de DMT1 en la membrana apical (f) en el tiempo (t) dado en minutos	103
3.8. Características de la visualización de las proteínas DMT1-EGFP y FPN1-TagRFP en cada célula Caco-2, utilizando microscopial confocal, cuando la concentración de calcio extracelular era de $10 \mu M$ y las células se desafiaron con $10 \mu M$ de FAS	104
3.9. Características de la visualización de las proteínas DMT1-EGFP y FPN1-TagRFP en cada célula Caco-2, utilizando microscopial confocal, cuando la concentración de calcio extracelular era de $1,5 mM$ y las células se desafiaron con $10 \mu M$ de FAS	104
3.10. Características de la visualización de las proteínas DMT1-EGFP y FPN1-TagRFP en cada célula Caco-2, utilizando microscopial confocal, cuando la concentración de calcio extracelular era de $3 mM$ y las células se desafiaron con $10 \mu M$ de FAS	105
3.11. Curvas multi-exponenciales que predicen el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP para cada célula Caco-2 estudiada, cuando la concentración de calcio extracelular era de $10 \mu M$ y las células se desafiaron con $10 \mu M$ de FAS	107
3.12. Curvas multi-exponenciales que predicen el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP para cada célula Caco-2 estudiada, cuando la concentración de calcio extracelular era de $1,5 mM$ y las células se desafiaron con $10 \mu M$ de FAS	108

3.13. Curvas multi-exponenciales que predicen el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP para cada célula Caco-2 estudiada, cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 <i>mM</i> y las células se desafiaron con 10 μM de FAS	109
3.14. Modelos lineales de la internalización de DMT1 desde la membrana apical, debida a un desafío de hierro (10 μM de FAS) junto con un cambio de la concentración de Ca^{2+} . Estos modelos se ajustan a los dos primeros datos de la fracción de DMT1 en la membrana apical (<i>f</i>) en el tiempo (<i>t</i>) dado en minutos	124

Capítulo 1. Introducción General

1.1 El hierro

El hierro (Fe) es uno de los elementos más abundante en la tierra (Dasa y Abera, 2018; Rodríguez y Mandalunis, 2018), y es el metal traza más abundante en las especies de mamíferos, cuyo suministro adecuado en la dieta es esencial para las funciones celulares y enzimáticas normales debido a su capacidad de ciclo constante entre dos estados de oxidación: ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}) (Hofer y col., 2008; Cassat y Skaar, 2013). El hierro interviene en el transporte y almacenamiento de oxígeno a los tejidos (por medio de la hemoglobina en los eritrocitos y la mioglobina en los miocitos), la síntesis de ADN y enzimas, función inmune y en una amplia variedad de procesos del metabolismo energético (He y col., 2008; Thumser y col., 2010; Zödl y col., 2010; Scheers, 2013; Lane y col., 2013; Chifman y col., 2014). Durante la producción de ATP, el hierro desempeña un papel indispensable ya que actúa como cofactor para los citocromos y los complejos de hierro-azufre de la cadena oxidativa (Lill y col., 2012). Este metal también es un cofactor crucial para funciones cerebrales importantes, incluida la plasticidad sináptica, la mielinización y la síntesis de neurotransmisores (Nnah y Wessling-Resnick, 2018).

En el ambiente intracelular reductor, el hierro contribuye con el estrés oxidativo y el daño a las macromoléculas, ya que su forma ferrosa (Fe^{2+}) cataliza la formación de radicales libres a través de la reacción de Haber-Weiss (Teucher y col., 2004; Zödl y col., 2010; Birben y col., 2012; Dias y col., 2013; Chifman y col., 2014; Nnah y Wessling-Resnick, 2018; Sangkhae y Nemeth, 2018). A un pH fisiológico, el hierro ferroso se oxida rápidamente a la forma férrica insoluble (Fe^{3+}), por lo que las células requieren proteínas que permitan el transporte de hierro y aseguren su biodisponibilidad, eviten su reactividad, nieguen este metal a los microorganismos invasores y protejan los tejidos del huésped del daño tisular debido a la formación de radicales libres (Ma y col., 2006; Villarroya y col., 2011; Tarifeño-Saldivia y col., 2018).

La biodisponibilidad del hierro se define como la proporción del hierro obtenido de la dieta que es absorbida y utilizada biológicamente, la cual depende de factores como el tipo y cantidad de hierro, la combinación de alimentos en la comida y el nivel de las reservas corporales de este metal (Wienk y col., 1999; Hurrell y Egli, 2010). El hierro dietético se encuentra en dos formas básicas: *hemo u orgánico*, abundante en el hígado (hemoglobina) y en las carnes rojas y blancas (mioglobina) (Scheers, 2013), y *no hemo o inorgánico*, presente en las verduras, cereales, frutas y algunos alimentos de origen animal como la leche y los huevos, y se encuentra en mayor proporción en la forma férrica (Seriki y col., 2017).

Aunque el hierro hemo u orgánico generalmente representa del 10 al 15 % de la ingesta dietética de hierro en una dieta omnívora, contribuye con un 40 % o más al hierro total absorbido por el cuerpo, ya que su absorción se ve menos afectada por factores dietéticos, por lo que ocurre de manera más eficiente que la absorción del hierro no hemo (Björn-Rasmussen y col., 1974; Hunt, 2002), debido a los transportadores específicos de hemo que permiten que el hierro en esta forma pase directamente a través de las membranas celulares y al torrente sanguíneo (Mann y Truswell, 2012). Por otro lado, se estima que el 85–90 % de la ingesta total de hierro proviene de la forma no hemo; sin embargo, la biodisponibilidad del hierro inorgánico para los organismos biológicos es relativamente baja (1–10 %), como consecuencia del aumento de las concentraciones de

oxígeno en el ambiente por la evolución de la fotosíntesis (Linder y col., 2006; Ganz, 2017). La leche materna es el único alimento con hierro no hemínico que tiene un porcentaje de absorción de aproximadamente 50 %, debido a su composición química, pues tiene un contenido más bajo de calcio, fósforo y proteínas, pero una mayor cantidad de lactoferrina y vitamina C (Luke y col., 1993); esto hace que en la leche humana el hierro esté más biodisponible que en la leche de vaca (Moslemi y col., 2018).

Un humano adulto promedio bien nutrido tiene aproximadamente 50 mg de hierro por kilogramo, que equivalen a 3–4 g de hierro para una persona de 70 kg (Andrews, 1999; Muñoz y col., 2009; Chifman y col., 2014). La mayor parte de este hierro es intracelular, donde la concentración de oxígeno es menor y la concentración de sustancias reductoras es alta (Ilbert y Bonnefoy, 2013). Alrededor del 65–75 % del hierro del cuerpo se encuentra en la hemoglobina de los eritrocitos, que es una proteína en los glóbulos rojos que transporta oxígeno a los tejidos del cuerpo (Dasa y Abera, 2018); el 10 % está en la mioglobina del músculo estriado, el 10–20 % se asocia a la ferritina dentro de hepatocitos y macrófagos, el 0,1 % se une a la transferrina en el torrente sanguíneo y el resto se distribuye en otros tipos de células (Zhang y Enns, 2008; Ganz, 2017).

En humanos, las principales fuentes de hierro (cerca del 90 %) incluyen el reciclaje de hierro de los eritrocitos senescentes, la absorción intestinal de hierro y la liberación de hierro almacenado de los hepatocitos (Ganz, 2017). Los macrófagos pueden fagocitar a los glóbulos rojos senescentes o dañados, extraer su hierro hemo y reciclarlo al líquido extracelular y al plasma; en este proceso, se recupera la cantidad de hierro necesaria para la eritropoyesis diaria (Ganz y Nemeth, 2012). Por otro lado, diariamente un adulto sano pierde ~0,025 % de su hierro total, equivalentes a 1–2 mg de hierro, principalmente a través de la descamación de las células epiteliales en el tracto digestivo y la piel, micro sangramiento fisiológico intestinal, sudor y orina, aunque esta pérdida de hierro aumenta en mujeres, niños y adolescentes en crecimiento, debido al sangrado menstrual y a las necesidades del crecimiento (Hurrell y Egli, 2010). En estado estable, el cuerpo compensa esta pérdida principalmente a través de la absorción intestinal de hierro (Scheers, 2013; Chifman y col., 2014; Sebastiani y col., 2016).

No se conoce ningún mecanismo biológico regulado conocido de excreción de hierro en los mamíferos (Ravia y col., 2005). Por lo tanto, el control estricto de la absorción intestinal de este metal desde el duodeno en respuesta a los requisitos y la disponibilidad del hierro celular es crucial para la homeostasis del hierro tanto a nivel sistémico como celular, de modo que esta absorción aumenta por la deficiencia de hierro, pero se reduce en condiciones de carga de hierro (Ma y col., 2002; Sharp y Srail, 2007; Andrews, 2008; Gkouvatsos y col., 2012; Ganz, 2013).

La falta de una apropiada regulación de la absorción de hierro desencadena alteraciones en la homeostasis del hierro, lo que puede provocar:

- La deficiencia de hierro (ID) es la deficiencia de micronutrientes más común en el mundo, afecta a más de 3 mil millones de personas en todo el mundo (Rudy y Mayer-Proschel, 2017), y se caracteriza por la pérdida de almacenamiento de hierro (ferritina < 12 $\mu\text{g/L}$) con concentración normal de hemoglobina (Dasa y Abera, 2018). La deficiencia de hierro puede ocurrir cuando las ingestas son bajas, por pérdida excesiva de sangre o cuando la absorción de hierro es inhibida por otros componentes de la dieta (Gaitán y col., 2011). La anemia por deficiencia de hierro (IDA), es el indicador más utilizado de esta deficiencia, se caracteriza por un bajo nivel de hemoglobina y se produce debido a que las reservas de hierro están

completamente agotadas y no hay suficiente hierro para la síntesis de hemoglobina (Ramakrishnan y Yip, 2002; Tidehag y col., 1995). Síntomas asociados con el transporte deteriorado de oxígeno están presentes en esta anemia (Brownlie y col., 2004; Scheers, 2013), la cual también aumenta la morbilidad y la mortalidad materna (Darnton-Hill, 1998; Dasa y Abera, 2018).

- La sobrecarga de hierro se asocia con aumentos en el hierro no unido a proteínas como resultado de la capacidad fisiológica de unión al hierro que se ve desbordada (Dasa y Abera, 2018). La sobrecarga de hierro está relacionada con varias enfermedades que implican cambios funcionales de la hemoglobina, como la talasemia y las hemoglobinopatías relacionadas, las cuales producen eritropoyesis ineficaz que estimula la absorción de hierro incluso si las reservas de hierro son adecuadas (Hurrell y Egli, 2010; Scheers, 2013). La hemocromatosis hereditaria, causada por una mutación en el gen HFE, es un trastorno autosómico recesivo muy común con un aumento inadecuado de la absorción de hierro que conduce a la carga de hierro de las células parenquimatosas en el hígado, páncreas, corazón y otros órganos, con el consiguiente daño de su estructura y deterioro de su función (Limdi y Crampton 2004; Zödl y col., 2010; Shawki y col., 2015), que puede causar cirrosis, carcinoma de hígado, insuficiencia cardíaca, diabetes mellitus y osteoporosis (Rodríguez y Mandalunis, 2018). En los últimos años, se han realizado varios estudios para investigar la relación entre la acumulación de hierro y las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la esclerosis múltiple (EM) (Huang, 2003; Popławska-Domaszewicz y col., 2014; Li y col., 2016). Sin embargo, no se ha establecido si la acumulación de hierro es un síntoma o una causa de estas enfermedades (Hofer y col., 2008). Por lo tanto, una mejor comprensión del transporte de hierro y los mecanismos de homeostasis pueden ayudar a profundizar nuestro conocimiento de estas enfermedades.

1.2 Proceso de absorción intestinal del hierro

En el proceso de absorción, el hierro se transporta desde el intestino hacia el torrente sanguíneo; sin embargo, el transporte de hierro a través del enterocito aún no se entiende completamente. La absorción de hierro es un proceso que tiene lugar predominantemente en la porción proximal del duodeno y el yeyuno superior, donde el pH aún es ácido y los enterocitos tienen un ribete en cepillo microvellosos en la membrana apical para maximizar el área de la superficie de absorción (Andrews, 2008). Varios factores como la fuente de alimento, la genética y la reserva de hierro corporal determinan la tasa de absorción de hierro (Moslemi y col., 2018). La Figura 1.1 muestra los principales componentes del proceso de absorción de hierro.

El hierro no hemo dietético (Fe^{3+}) debe reducirse a la forma ferrosa o soluble (Fe^{2+}) antes de ser absorbido por el intestino, lo cual se logra mediante agentes reductores de la dieta como el ácido ascórbico, o por medio de reductasas férricas endógenas como el citocromo B duodenal (DcytB) localizado en la membrana de ribete de cepillo (BBM: *brush border membrane*) del duodeno (Ma y col., 2006b; Zhang y Enns, 2008; Andrews, 2008; Dasa y Abera, 2018). Si el hierro de la dieta se suministra directamente como hierro ferroso, la actividad de DcytB sería prescindible (Teucher y col., 2004).

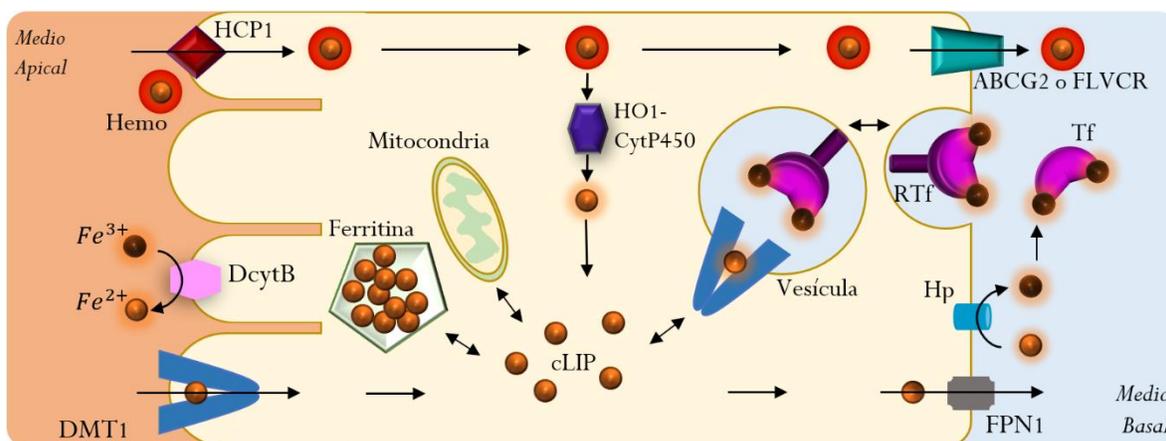


Figura 1.1. Principales componentes del proceso de absorción de hierro.
Adaptada de Cegarra y col. (2019).

Luego, el hierro no hemo en su forma reducida, es transportado a través de la BBM de los enterocitos al citoplasma, principal o únicamente a través del Transportador de Metal Divalente 1 (DMT1: *Divalent Metal Transporter-1*), un simportador de hierro que co-transporta protones y Fe^{2+} con una estequiometría 1:1, situado en la BBM de los enterocitos cerca de DcytB (Andrews, 2008; Mackenzie y col., 2005; Dasa y Abera, 2018). Sin embargo, se ha informado que DMT1 también puede mediar en el transporte de Fe^{2+} de forma desacoplada del gradiente de H^+ (Mackenzie y col., 2005; Colins y col., 2017) que se genera por el transporte activo secundario de iones de sodio (Beck y Coad, 2017). DMT1 también puede transportar otros cationes metálicos divalentes (Mn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}), que inhiben de manera competitiva el transporte de los iones ferrosos si están presentes en altas concentraciones (Dasa y Abera, 2018; Andrews, 2008; Illing y col., 2012). Una vez dentro del enterocito, el hierro intracelular se puede transportar a través de un proceso endocítico en el que las vesículas derivadas de BBM que contienen DMT1 se fusionan con las vesículas derivadas de la membrana basolateral (BLM: *basal lateral membrane*) que contienen transferrina no unida a hierro, siendo la transferrina una glicoproteína con dos sitios de unión para Fe^{3+} (Ma y col., 2006b). DMT1 también se ubica en la membrana de los endosomas de reciclaje de todos los demás tipos de células, donde transporta Fe^{2+} desde el endosoma hasta el citosol, durante la captación de hierro mediada por transferrina a través de la endocitosis de transferrina (Gunshin y col., 2005; Zhang y Enns, 2008; De Domenico y col., 2008).

Después de entrar en el enterocito, Fe^{2+} pasa a formar parte del grupo de hierro lábil citosólico (cLIP: *cytosolic Labile Iron Pool*), una reserva de hierro quelable con actividad redox, que representa cerca del 3 % del hierro celular total, pero esta proporción aumenta cuando aumenta la concentración de Fe^{2+} en la BBM de los enterocitos (Kakhlon y Cabantchik, 2002; Bernhardt y Inestrosa, 2008). Debido al entorno reductor de la célula, el hierro en el cLIP está, en promedio, en la forma Fe^{2+} , aunque se espera la presencia de una forma Fe^{3+} transitoria como resultado de oxidaciones celulares (Arredondo y Núñez, 2005). Esto hace que las células con cLIP más alto exhiben invariablemente niveles más altos de especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, el cLIP es un marcador no solo del contenido total de hierro de la célula, sino que también determina el estado redox de esta (Kruszewski, 2003; Núñez y col., 2004).

Según los requisitos sistémicos del organismo, el hierro del cLIP puede depositarse en ferritina (para el almacenamiento), ser absorbido por las mitocondrias (para el metabolismo), o transferirse al torrente sanguíneo mediante ferroportina (FPN) desde la BLM en tiempos de escasez sistémica de hierro, donde se oxida de Fe^{2+} a Fe^{3+} por hefaestina (Hp), una oxidasa multicobre (Andrews, 2008; Breuer y col., 1995; Brown y col., 2004). La importancia de la hefaestina en la absorción se hace evidente cuando ocurren mutaciones en su gen, que producen anemia microcítica e hipocrómica que es refractaria a la terapia oral con hierro (Núñez, 2010). FPN es el único exportador de hierro celular conocido, y se controla postraduccionalmente por el péptido hepcidina (Roughead y col., 2005).

El hierro férrico (Fe^{3+}) puede circular en el torrente sanguíneo unido a la transferrina (Tf), que puede ingresar a las células que tienen receptores específicos de transferrina (RTf), a través de un proceso de endocitosis mediada por el receptor (Ganz, 2017; Hofer y col., 2008; Yanatori y col., 2017). Esto implica que, tanto la ferritina como la transferrina pueden secuestrar el hierro para mantenerlo en una forma no reactiva (Andrews, 2008; Ma y col., 2006b). Generalmente, un promedio de 20–40 % de los sitios de unión a transferrina están saturados con hierro férrico (Ganz, 2017).

El estado de hierro corporal puede evaluarse entonces mediante una serie de índices bioquímicos que incluyen la concentración de hemoglobina en sangre, la concentración de ferritina, la saturación de transferrina, la concentración del receptor de transferrina en el plasma, siendo preferible utilizar una combinación de estos índices para mejorar la especificidad, como la combinación de ferritina y hemoglobina, que es la más utilizada para monitorear el estado del hierro (Benkhedda y col., 2010).

El mecanismo de absorción de hierro hemo sigue siendo incierto. Sin embargo, se ha propuesto que puede ser absorbido por la Proteína Transportadora Hemo 1 (HCP1, *Haem Carrier Protein 1*) ubicada en la membrana apical de los enterocitos, que es principalmente un transportador de folato acoplado a H^+ , y que puede funcionar como un receptor de membrana que media la endocitosis o como un transportador de hierro hemo (Laftah y col., 2009; Hofer y col., 2008; Herrera y col., 2015). Una vez que el hierro hemo se internaliza en el enterocito, se cataboliza mediante un complejo multienzimático HO1-CytP450 (hemooxigenasa citosólica-1/NADPH-Citocromo P450 reductasa) en biliverdina y monóxido de carbono, liberando Fe^{2+} en el citosol a través de un mecanismo actualmente desconocido que se cree está mediado por DMT1 (Raffin y col., 1974; Zhang y Enns, 2008; Yanatori y col., 2017). Se ha propuesto que las proteínas de transporte hemo recientemente identificadas del grupo FLVCR (receptor del subgrupo C del virus de la leucemia felina) y ABCG2 (proteína G2 del casete de unión al ATP) transportan el exceso de hierro hemo directamente al torrente sanguíneo (Krishnamurthy y col., 2007; Chifman y col., 2014).

A continuación, se presenta una descripción más detallada de los principales componentes del proceso de absorción intestinal de hierro.

1.2.1 Transportador de Metal Divalente 1 (DMT1)

El Transportador de Metal Divalentes 1 (DMT1) es una proteína de transmembrana, que transporta hierro en su forma reducida (Fe^{2+}) a través de la membrana luminal de los enterocitos duodenales, mediante un mecanismo electrogénico que hasta ahora se sabe implica el co-transporte de Fe^{2+} y un protón, por lo que depende de la presencia de protones lumbales (Andrews, 1999; Arredondo y Núñez, 2005; Yiannikourides y Latunde-Dada,

2019). Mutaciones en el gen DMT1 en ratas y ratones causan un defecto en la absorción intestinal de hierro, lo que sugiere que este transportador juega un papel importante en la absorción de hierro por las células intestinales (Fleming y col., 1998; Su y col., 1998). También se observó que los ratones que son homocigotos para una delección dirigida en DMT1 son severamente anémicos debido a la incapacidad de absorber hierro a través del intestino y no sobreviven más de 7 días (Gunshin y col., 2005). DMT1 también es crítico para la recuperación de hierro desde los endosomas de reciclaje durante la captación de hierro celular mediada por el receptor de transferrina en células precursoras eritroides (Fleming y col., 1998; Gunshin y col., 2005; Veuthey y Wessling-Resnick, 2014).

Estudios en ratones indican que DMT1 se expresa a lo largo de todo el intestino delgado, pero solo aumenta su expresión en la parte proximal del duodeno en respuesta a la privación de hierro, lo que sugiere que el duodeno proximal es el sitio principal para la absorción de hierro (Johnston y col., 2006; Scheers, 2013). En los enterocitos duodenales polarizados, DMT1 se ubica cerca de DcytB, y transporta Fe^{2+} a través de la BBM y hacia el citoplasma (Andrews, 2008; Mackenzie y col., 2005; Dasa y Abera, 2018). La eficiencia del transporte de hierro al enterocito con DMT1 está determinada en parte por la disponibilidad de la forma ferrosa (Fe^{2+}).

Si bien DMT1 es una proteína simportadora, también puede mediar los flujos de H^+ o Fe^{2+} de manera no acoplada, es decir, puede funcionar como un uniportador. El transporte de H^+ desacoplado del transporte de cationes divalentes, es una vía de “fuga” de H^+ , que se ha demostrado por las corrientes internas y la acidificación intracelular observadas después de cambiar el pH de 7,5 a 5,5 en ovocitos de *Xenopus* que expresan el transportador de metal divalente (Gunshin y col., 1997; Mackenzie y col., 2007; Shawki y Mackenzie, 2010).

La transcripción del gen SLC11A2 que codifica DMT1 humano (hDMT1), origina cuatro transcripciones de ARNm diferentes llamadas DMT1-1A/IRE(+), DMT1-1A/IRE(-), DMT1-1B/IRE(+) y DMT1-1B/IRE(-), que comparten un segmento conservado de 531 aminoácidos, y difieren en sus extremos N y C-terminal (Hubert y Hentze, 2002). Dos de las isoformas tienen un elemento sensible al hierro (IRE) en su región no codificante 3' del ARNm (3'-UTR) y se denominan IRE(+), mientras que las otras se llaman IRE(-) porque carece de ese elemento (Lee y col., 1998). En el extremo C-terminal, las isoformas IRE(+) tienen un segmento de 18 aminoácidos, mientras que en las isoformas IRE(-) se encuentra un residuo de 25 aminoácidos (Mims y Prchal, 2005; Montalbetti y col., 2013). Además, se encuentra una variación adicional que depende de si la región no codificante 5' del ARNm (5'-UTR) es el exón 1A o el exón 1B (Arredondo y Núñez, 2005; Aguirre y col., 2005). El exón 1A agrega 29–31 aminoácidos al extremo N-terminal de DMT1 (Mims y Prchal, 2005; Montalbetti y col., 2013).

Según lo reportado en literatura, las isoformas de DMT1 se distribuyen como sigue: DMT1-1A/IRE(+) se localiza en la membrana plasmática, DMT1-1A/IRE(-) y DMT1-1B/IRE(-) en los endosomas de reciclaje, y DMT1-1B/IRE(+) en endosomas tardíos y lisosomas (De Domenico y col., 2008; Yanatori y col., 2016). Varios autores han informado la expresión de la isoforma DMT1-1A/IRE(+) es predominante en enterocitos duodenales (Gunshin y col., 1997; Canonne-Hergaux y col., 1999) y en los riñones (Hubert y Hentze, 2002). La diferencia clave entre las isoformas IRE(+) e IRE(-) es el hecho de que la presencia de IRE confiere regulación postranscripcional por el estado del hierro, ya que la disminución del suministro de hierro promueve la traducción de DMT1-IRE(+) con las proteínas reguladoras de hierro (IRP), para aumentar la absorción de hierro (Gunshin y col.,

2001; Pantopoulos, 2004; Canonne-Hergaux y col., 1999). Por otro lado, el exón 1A contiene elementos de respuesta a la hipoxia (HREs), que en el intestino son reconocidos por HIF-2 α para modular la expresión de DMT1 en condiciones hipóxicas (Mastrogiannaki y col., 2009; Shah y col., 2009).

La isoforma hDMT1-1A/IRE(+) está constituida por 590 aminoácidos, tiene una masa de ~65 kDa, 12 dominios transmembrana, y sus extremos N y C-terminal están dentro del citoplasma (Gruenheid y col., 1995; Gunshin y col., 1997). Todas las isoformas de DMT1 contienen dos residuos de asparagina en su bucle extracelular predicho entre los dominios transmembrana 7 y 8, sitios de N-glicosilación previstos en el cuarto bucle extracelular y un motivo de transporte de consenso en el cuarto bucle intracelular (Gruenheid y col., 1995; Gunshin y col., 1997; Yanatori y Kishi, 2018). Se sugiere que tres residuos cargados negativamente y altamente conservados en los dominios transmembrana 1, 4 y 7 de DMT1 son esenciales para el transporte de cationes. Además, dos residuos de histidina en el dominio transmembrana 6 parecen críticos para la función normal (Lam-Yuk-Tseung y col., 2003).

Dos de las cuatro isoformas de DMT1 no contienen la secuencia IRE en su ARNm y, por lo tanto, la concentración intracelular de Fe²⁺ no puede controlar la traducción de estas isoformas a través de la actividad de las proteínas reguladoras del hierro (IRP) (ver sección 1.4.3 para más detalles) (Aguirre y col., 2005; Zhang y col., 2009).

Se ha reportado que hDMT1 alcanza su actividad máxima de transporte de hierro ferroso a pH 6,75, que es equivalente al pH de la BBM duodenal (Worthington y col., 2000). Por otro lado, hDMT1 también actúa como un transportador dependiente de protones capaz de utilizar varios iones de metales divalentes como sustrato, los cuales se clasificaron según la selectividad como sigue: Cd²⁺ > Fe²⁺ > Co²⁺, Mn²⁺ >> Zn²⁺; Ni²⁺; VO²⁺, y hasta ahora se sabe que Co²⁺ y Mg²⁺ inhiben competitivamente la absorción de Fe²⁺ (Illing y col., 2012). Respecto al cobre, Arredondo y col. (2003) demuestran que DMT1 es un transportador cobre fisiológicamente relevante en las células intestinales, pues reportaron una inhibición del 80 y el 48 % de la absorción de hierro y cobre, respectivamente, cuando las células Caco-2 son tratadas con un oligonucleótido antisentido de DMT1, y además observaron que células con bajo contenido de hierro transportaron cuatro veces más hierro y tres veces más cobre que las células con alto contenido de hierro; por otro lado, las observaciones de Wang y col. (2018) muestran que, en ratones, la expresión de DMT1 en el intestino es esencial para la asimilación de cantidades suficientes de Cu²⁺ en la dieta para mantener la homeostasis sistémica del cobre durante la anemia por deficiencia de hierro (IDA). Datos recientes indican que hDMT1 expresado en ovocitos de *Xenopus*, no es capaz de transportar Ca²⁺, en ausencia o presencia de hierro, y que la captación de ⁵⁵Fe²⁺ mediada por DMT1 se inhibe en un 73 % en presencia de Ba²⁺, 58 % con Sr²⁺ y 28 % con Mg²⁺ (Shawki y Mackenzie, 2010).

Toyohara y col. (2005) caracterizaron la actividad de transporte de iones metálicos del transportador de metal divalente de ostiones (scDMT: *scallops* DMT), y encontraron que scDMT tiene la capacidad de transportar Ca²⁺, a diferencia de otros DMT reportados hasta ahora, aunque también puede transportar Fe²⁺ y Cd²⁺. Este hallazgo sugiere que el homólogo de DMT1, scDMT, que carece del elemento sensible al hierro (IRE), funciona fisiológicamente como un transportador de Ca²⁺ en condiciones naturales, posiblemente para que los ostiones puedan transportar Ca²⁺ del agua de mar por las branquias y el intestino y utilizarlo en el proceso de biomineralización (Ramajo y col., 2016). Se informó además de una mutación única de DMT1 en ratones con anemia microcítica (*mk*) y en ratas

de Belgrado (*b*), G185R, la cual consiste en una sustitución de glicina por arginina en el residuo 185 dentro del dominio transmembrana 4 de DMT1 de *mk* y *b* (Su y col., 1998; Ehrnstorfer y col., 2014), que afecta severamente el transporte de hierro mediado por DMT1 que lleva a la anemia en estas especies, y que hace que DMT1 mutante exhiba una nueva permeabilidad constitutiva a Ca^{2+} (Xu y col., 2004). Por lo tanto, existen al menos dos reportes que sugieren una relación entre Ca^{2+} y DMT1.

Linder y col. (2006) determinaron que el proceso de absorción de Fe^{2+} mediado por DMT1 era un proceso saturable, que podía caracterizarse por una constante de Michaelis (K_M) cercana a $7 \pm 1 \mu\text{M}$, cuando las células intestinales Caco-2 se desafiaron en el compartimiento apical con $1 \mu\text{M}$ de $^{59}\text{Fe}^{2+}$ en presencia de 1 mM de ascorbato a pH 7. Por otro lado, Thumser y col. (2010) estudiaron la captación de cloruro férrico (FeCl_3) a través de la membrana apical de las células Caco-2 a pH 6,0, y observaron nuevamente la naturaleza saturable de la absorción de hierro, donde la velocidad de captación máxima (V_{max}) de DMT1 aumentaba y la constante K_M disminuía, según aumentaba la concentración ascorbato, e informaron un $K_M \approx 13,2 \pm 1,6 \mu\text{M}$ para la captación de ^{55}Fe en las células Caco-2 en ausencia de ascorbato y un K_M cercano a 7 en presencia de ascorbato. Esto muestra el efecto potenciador en la captación de hierro del ascorbato (vitamina C), el cual es capaz de reducir el hierro férrico a ferroso (Johnson y col., 2005).

1.2.2 Ferroportina (FPN)

La ferroportina (FPN), también denominada como IREG1 (*Iron Regulated Gene 1*), SLC40A1 o MTP1, es un miembro de la familia de transportadores SLC40, y es la única proteína exportadora del hierro identificada hasta ahora en vertebrados (Arredondo y Núñez, 2005; di Patti y col., 2014; San Martín y col., 2008).

FPN es una proteína de membrana que se expresa principalmente en tejidos asociados con el transporte de hierro, como enterocitos duodenales, células hepáticas de Kupffer y macrófagos, hepatocitos y células placentarias, aunque su presencia también se ha descrito en los glóbulos blancos implicados en la eritrofagocitosis, neuronas, células de glioma y astrocitos cerebrales (McKie y col., 2000; Burdo y col., 2001; di Patti y col., 2004; Rice y col., 2009; Drakesmith y col., 2015).

FPN modula el flujo de salida de hierro desde los enterocitos a la circulación durante el proceso de absorción intestinal de hierro, y media la exportación de hierro para su reutilización por la médula ósea en las células de Kupffer (McKie y col., 2000; Devalia y col., 2002). Además, FPN también se usa para exportar hierro almacenado de los hepatocitos y liberar hierro materno de la placenta a la circulación fetal (Drakesmith y col., 2015). Debido a que FPN modula la cantidad de hierro que se pone a disposición del cuerpo desde los enterocitos, su expresión está estrechamente regulada postraduccionalmente por la hormona hepática hepcidina (Yiannikourides y Latunde-Dada, 2019; Preza y col., 2011).

La isoforma 1A de ferroportina (FPN1A o FPN), abundante en los macrófagos, contiene un elemento de respuesta al hierro (IRE) en la región no codificante 5', que en condiciones de deficiencia de hierro se une a las proteínas reguladoras del hierro (IRP), causando represión traduccional (ver sección 1.4.3 para más detalles) (Lymboussaki y col., 2003). El sistema IRP/IRE es incapaz de reprimir completamente la traducción de ferroportina en los enterocitos duodenales con deficiencia de hierro, lo cual se explica por la presencia de una isoforma de ferroportina, denominada FPN1B, que carece del segmento

IRE en la región 5', pero produce una proteína idéntica (Zhang y col., 2009). Por lo tanto, FPN1B se traduce continuamente aún en condiciones de escasez de hierro (Drakesmith y col., 2015), y también se expresa en las células progenitoras de eritrocitos (Cianetti y col., 2005; Zhang y col., 2011).

En los enterocitos, la expresión de FPN es inducida por una dieta deficiente de hierro, mientras que en los macrófagos el hierro aumenta los niveles de ARNm de FPN (McKie y col., 2000; Yang y col., 2002). Un estudio con células de neuroblastoma SH-SY5Y y neuronas del hipocampo, encontró que la acumulación de hierro celular se asocia con una mayor expresión de FPN, lo que indica que en las células neuronales FPN tiene una regulación similar a los macrófagos (Aguirre y col., 2005).

FPN humana está constituida por 571 aminoácidos, con 12 dominios transmembrana de 21-23 aminoácidos, y tiene una masa de 67 kDa (De Domenico y col., 2008; di Patti y col., 2014). Las características estructurales relevantes para la función FPN son una gran asa intracelular entre los dominios transmembrana 6 y 7, que contiene residuos claves para la internalización y degradación de FPN (De Domenico y col., 2007; Qiao y col., 2012) y un asa extracelular entre los dominios transmembrana 7 y 8, donde se encuentra el sitio de unión al péptido hepcidina (Roughead y col., 2005; Preza y col., 2011; Rochette y col., 2014).

La relevancia de FPN para la absorción de hierro se demostró en ratones con una delección específica de FPN, que presentaban letalidad embrionaria debido a la incapacidad de transferir hierro de la madre a los embriones deficientes en FPN; además, una desactivación condicional de FPN en el duodeno causa anemia significativa en ratones (Donovan y col., 2005).

Las mutaciones en el gen que codifica la ferroportina causan una forma de sobrecarga de hierro, llamada 'enfermedad de ferroportina' o hemocromatosis hereditaria tipo IV (di Patti y col., 2014), caracterizada por dos fenotipos distintos, uno en el que los pacientes muestran carga de hierro en los macrófagos y baja saturación de transferrina, y uno en el que los pacientes muestran una carga de hierro en los hepatocitos y una alta saturación de transferrina (Rice y col., 2009).

La exportación de un Fe^{2+} por parte de FPN va acompañada de la importación de dos H^+ para mantener el equilibrio de carga, es decir, FPN es una proteína antiportadora de $\text{Fe}^{2+}/2\text{H}^+$ y el mecanismo de transporte electroneutro es una probable adaptación para superar el potencial de membrana en reposo negativo que obstaculizaría significativamente la exportación de cationes (Pan y col., 2020). Las estructuras de FPN de mamíferos muestran dos sitios de unión de iones de metales de transición, denominados Sitio 1 (S1) y Sitio 2 (S2), y cada sitio de unión de iones se compone de solo dos residuos, Asp39 e His43 para S1, y Cys326 e His507 para S2, pero, hasta la fecha, sigue sin resolverse cómo S1 y S2 median el transporte acoplado de Fe^{2+} y H^+ (Billesbølle y col., 2020; Pan y col., 2020). Además, se cree que el Fe^{2+} exportado por FPN se reduce en la cara externa de la membrana basal por la ferroxidasa hefaestina (Hp) (Núñez, 2010).

Se ha informado que la exportación de iones de hierro por parte de FPN humana alcanza su actividad máxima a pH 7,5, mientras que un pH más bajo (5,0–6,5) inactiva el transporte y un pH más alto (8.0 y 8.5) reduce ligeramente el transporte (Pan y col., 2020).

Estudios recientes muestran que la eliminación de Ca^{2+} extracelular elimina el flujo de hierro mediado por FPN humana en ovocitos *Xenopus* y células embrionarias de riñón humano (HEK: *Human Embryonic Kidney*), lo cual indicaría que el calcio es un cofactor requerido en transporte de hierro mediado por FPN humana y que la actividad de FPN

podría estar limitada en condiciones de hipocalcemia (Deshpande y col., 2018). Shen y col. (2023) identificaron un solo sitio de unión a Ca^{2+} distinto de los sitios de unión a Fe^{2+} , y además mostraron que FPN humana en liposomas y células HEK se une y media en el transporte de Ca^{2+} , y que este transporte de Ca^{2+} se inhibe significativamente en presencia de Fe^{2+} (pero no al revés) y no se ve afectado por un gradiente de H^+ ni la ausencia de Na^+ , K^+ o Cl^- , sugiriendo que FPN es un uniportador de Ca^{2+} .

1.2.3 Ferritina

La principal proteína intracelular de almacenamiento de hierro tanto en procariontas como en eucariotas es la ferritina, y se considera la primera línea de defensa contra la sobrecarga de hierro, ya que el hierro en exceso en el citoplasma es dirigido a ella (Aguirre y col., 2005). Esta proteína se encuentra en la mayoría de los tejidos como proteína citosólica, pero se secretan pequeñas cantidades en el suero, donde funciona como transportador de hierro (Knovich y col., 2009).

La ferritina es un complejo proteico globular de 450–500 *kDa* que consta de 24 subunidades proteicas que forman una nanojaula hueca con un diámetro exterior de unos 12 *nm* y un diámetro interior de la cavidad de unos 8 *nm*, dentro de la cual puede almacenar alrededor de 4.500 iones de hierro férrico (Fe^{3+}) como un mineral de ferrihidrita (Arredondo y Núñez, 2005; Wang y col., 2017). En los vertebrados, las subunidades son de dos tipos, denominadas H (~21 *kDa*) y L (~19 *kDa*), y sus proporciones varían ampliamente según el tipo de tejido y pueden modificarse en condiciones inflamatorias e infecciosas (Scheers, 2013; Knovich y col., 2009).

Cuando la ferritina almacena una gran cantidad de hierro en esta proteína, puede formar un complejo y fusionarse al lisosoma, degradándose en una mezcla de péptidos y hemosiderina, compuesta esencialmente por óxido férrico tóxicos altamente insolubles (Miyazaki y col., 2002).

La ferritina sirve para almacenar el hierro de forma no tóxica, depositarlo en forma segura y transportarlo a las zonas donde se necesite (Heeney y Andrews, 2004). El hierro puede ser liberado desde la ferritina para satisfacer la demanda metabólica si los requerimientos de hierro en el organismo aumentan; además, si el hierro almacenado dentro de la ferritina de los enterocitos no se utiliza, es excretado a través del desprendimiento de enterocitos al final de su vida útil de 3 a 4 días (Sangkhae y Nemeth, 2018).

La ferritina que no contiene hierro se llama apoferritina, y la forma que contiene hierro se denomina holoferitina o simplemente ferritina. La concentración de hierro en el citoplasma controla la traducción de ferritina, ya que la expresión de esta proteína aumenta al elevarse la concentración intracelular de hierro (Harrison y Arosio, 1996).

1.2.4 Transferrina (Tf) y Receptores de Transferrina (RTf)

La transferrina (Tf) es una glicoproteína que se encuentran en los vertebrados, la cual se une al hierro y media su transporte a través del plasma sanguíneo (Crichton y Charlotheaux-Wauters, 1987). El hígado es el sitio principal de síntesis de transferrina, pero otros tejidos y órganos, incluido el cerebro y la retina, también producen transferrina, la cual tiene una vida media de 8 días en el suero (Baker y Lindley, 1992; De Domenico y col., 2008; Hall y col., 2001).

La transferrina humana es una glicoproteína que consta de una cadena polipeptídica de 679 aminoácidos, tiene una masa de aproximadamente 80 *kDa*, y está compuesta por dos dominios de 40 *kDa*, conocidas como lóbulo N y lóbulo C, los cuales tienen una homología muy alta y están separados por una secuencia enlazadora corta (Gomme y col., 2005; Kawabata, 2018). Cada dominio es capaz de unir un ion de hierro férrico (Fe^{3+}) y, por lo tanto, Tf puede tener hasta dos iones Fe^{3+} unidos (Messori y Kratz, 1994; Candelaria y col., 2021). La afinidad de la transferrina por el Fe^{3+} es muy alta a pH 7,4 (constante de asociación de 10^{20} M^{-1}), pero disminuye progresivamente con la disminución del pH por debajo de la neutralidad (Aisen y col., 1978).

Cuando no está unida al hierro, la transferrina se conoce como apotransferrina (apo-Tf), y también puede estar unida a un ión férrico (transferrina monoférrica) o dos iones férricos (holo-transferrina (holo-Tf) o transferrina diférrica) (Daniels y col., 2006; Kawabata, 2018).

Una vez que el hierro absorbido desde la dieta se libera al torrente sanguíneo, se une en su mayoría a la transferrina (Lane y col., 2013). Cuando se une a la Tf, el Fe^{3+} es soluble y no reactivo, lo que le permite ingresar al sistema circulatorio (Knovich y col., 2009). El hierro Fe^{3+} que no se une a Tf se denomina hierro no unido a transferrina (NTBI), y puede causar daño celular al estar en su forma reactiva (Agarwal, 2007; Chifman y col., 2014).

La apo-transferrina, a pH fisiológico, se une en la sangre a dos iones de Fe^{3+} con alta eficiencia y los transporta a la superficie celular para su internalización a través de la interacción con el receptor de transferrina (RTf) (Morgan, 1981; Richardson y col., 2010).

El receptor de transferrina (RTf) es una proteína transportadora holo-Tf, necesaria para la importación de hierro a la célula (Cheng y col., 2004). A pH fisiológico, la constante de asociación para la transferrina diférrica y el RTf es 30 veces mayor que para la transferrina monoférrica y 500 veces mayor que la del apo-transferrina (Ponka y Lok, 1999), siendo esta última unión hasta ahora indetectable en muchos tipos de células (Alvarez-Hernandez y col., 1998), aunque en las células Caco-2 la apo-transferrina sí puede unirse al RTf e internalizarse en vesículas (Ma y col., 2002).

Los receptores de transferrina (RTf) en humanos están presentes en la membrana basolateral del epitelio intestinal y en la mayoría de las membranas de otras células del cuerpo (Alvarez-Hernandez y col., 1998). Hay dos tipos de receptores de transferrina en humanos: el receptor de transferrina 1 (RTf1) que se expresa de forma ubicua, se une a Tf con mayor afinidad y que se regula en respuesta a la concentración de hierro intracelular, y el receptor de transferrina 2 (RTf2) que es menos común, cuya expresión está restringida a ciertos tipos de células (predominantemente en los hepatocitos), no se ve afectada por las concentraciones de hierro intracelular y cuya unión a la transferrina tiene una afinidad 25-30 veces menor que RTf1 (Lawrence, 1999; Kawabata y col., 1999; Deaglio, 2002). Por lo tanto, la captación de hierro mediada por RTf1 es la vía principal para la adquisición de hierro por la mayoría de las células y especialmente por los eritrocitos en desarrollo (Candelaria y col., 2021).

RTf1, es una glicoproteína transmembrana tipo II de 90 *kDa* que consta de 760 aminoácidos, y se encuentra en la superficie celular como homodímeros (180 *kDa*) unidos por dos enlaces disulfuro (Daniels y col., 2006). Cada monómero de RTf1 se une a una molécula de holo-Tf (Candelaria y col., 2021). Un monómero RTf1 está compuesto por un gran dominio C-terminal extracelular (671 aminoácidos) que contiene el sitio de unión de Tf, un dominio transmembrana (28 aminoácidos) y un dominio N-terminal intracelular (61 aminoácidos) (Daniels y col., 2006).

Las bajas concentraciones de hierro celular promueven la expresión de RTf1, mientras que la expresión de RTf1 disminuye en presencia de exceso de hierro (Kawabata, 2018). En condiciones de deficiencia de hierro intracelular, la expresión de RTf1 está regulada a nivel postranscripcional por las proteínas proteína reguladora de hierro (IRP1 e IRP2), las cuales se unen a los elementos sensibles al hierro (IREs) que se encuentra en la región no codificante 3' del ARNm del RTf, y una vez que se produce la unión, el ARNm se estabiliza y se inhibe la degradación. En presencia de exceso de hierro, las IRPs pierden sus interacciones con los IRE, lo que resulta en la desestabilización y degradación del ARNm de RTf (Yikilmaz y col., 2005; Walden y col., 2006). Por lo tanto, el receptor de transferrina ayuda a mantener la homeostasis del hierro celular (Macedo y Sousa, 2008).

El complejo formado por la unión de holo-Tf con el RTf1, se transporta al interior de la célula en una vesícula a través de la endocitosis mediada por receptor (Lawrence, 1999; Ganz, 2017; Candelaria y col., 2021). Los protones se bombean hacia la vesícula por una bomba de protones, lo que reduce el pH de la vesícula a alrededor de 5,5, provocando un cambio conformacional tanto en Tf como en RTf1 que desestabiliza la unión de Fe^{3+} a Tf, permitiendo así que la transferrina libere sus iones de hierro (Iacopetta y Morgan, 1983; Ohgami y col., 2006; Kawabata, 2018). Luego, el hierro liberado se reduce de Fe^{3+} a Fe^{2+} mediante la reductasa férrica STEAP3 (*six transmembrane epithelial antigen of prostate 3*), y es transportado fuera de la vesícula hacia el citosol por DMT1 (Andrews, 1999; Tabuchi y col., 2000), donde puede ingresar al cLIP (Kakhlon y col., 2002) o almacenarse en la ferritina (Philpott, 2012). Apo-Tf permanece unido al RTf1 mientras están en la vesícula; luego, ambos se transportan a través del ciclo endocítico de regreso a la superficie celular, donde el RTf1 libera a apo-Tf al torrente sanguíneo, quedando listos para otra ronda de absorción de hierro (Alvarez-Hernandez y col., 1998; De Domenico y col., 2008).

1.3 Mecanismos de regulación de la absorción de hierro

Se conocen cuatro mecanismos que regulan la absorción de hierro después de una exposición al hierro, con tiempos de respuesta que varían de minutos a días (Núñez, 2010). Estos se describen a continuación.

1.3.1 Regulación sistémica

El estado nutricional del hierro, la hipoxia, la inflamación crónica y la obesidad, regulan los niveles sistémicos de hierro a través de la secreción del polipéptido hepcidina (Hpc) (Herrera y col., 2015; Scheers, 2013).

La hepcidina, pequeño péptido de 25 aminoácidos producido en el hígado y en el tejido adiposo, es el regulador clave de los niveles sistémicos de hierro, ya que controla tanto su absorción intestinal como la cantidad de este metal utilizado por macrófagos (Krause y col., 2000; Park y col., 2000; Hurrell y Egli, 2010). La hepcidina disminuye la liberación de hierro desde los enterocitos al torrente sanguíneo por medio de su unión con ferroportina, la cual induce la internalización y degradación de FPN dependiente de ubiquitina, afectando la salida del hierro celular al torrente sanguíneo (Qiao y col., 2012; Tarifeño-Saldivia y col., 2018). Por lo tanto, el incremento en los niveles de hepcidina reduce los niveles plasmáticos de hierro y aumenta los niveles de ferritina para el almacenamiento de este metal (Scheers, 2013; Cediél-Giraldo y col., 2016). La regulación sistémica mediada por hepcidina es lenta, alcanzando los 3–4 días para observar variaciones significativas en los niveles de este péptido (Núñez, 2010).

Se ha observado que los ratones *knock-out* para el gen de la hepcidina muestran una marcada sobrecarga de hierro (Nicolas y col., 2002), mientras que los ratones modificados genéticamente que sobreexpresan hepcidina experimentan mortalidad postnatal debido a anemia hipocrómica microcítica severa asociada con una reducción dramática en los niveles de proteína ferroportina en los macrófagos del bazo, ya que la hepcidina en los macrófagos induce la internalización y la degradación lisosomal de FPN (Nicolas y col., 2003; Rivera, 2005; Delaby y col., 2005). En el modelo de células de macrófagos THP-1 *in vitro*, la hepcidina también disminuyó significativamente los niveles de proteína ferroportina (Nemeth, 2004). Sin embargo, aunque se ha observado una disminución significativa en la absorción de hierro tanto en el duodeno de ratones como en las células Caco-2 después del tratamiento con hepcidina, los mecanismos por los cuales la hepcidina controla la homeostasis intestinal del hierro son menos claros. El tratamiento con hepcidina en la línea celular Caco-2 induce una disminución de la expresión de DMT1, pero no altera los niveles de FPN, lo que sugiere que la hepcidina podría unirse a la FPN y bloquear su función de salida sin inducir su subsiguiente degradación (Nemeth, 2004; De Domenico y col., 2007; Chung y col., 2009).

1.3.2 Regulación transcripcional

Este tipo de regulación tiene un tiempo de respuesta de 12–36 horas, y el aumento en la concentración de hierro induce la transcripción de FPN (Zoller y col., 2002). Sin embargo, se necesitan más estudios sobre este mecanismo de inducción.

La regulación transcripcional del gen de la hepcidina es un proceso complejo, que está regulado por los niveles de hierro. La expresión de hepcidina aumenta cuando las reservas corporales de hierro son suficientes, pero también bajo condiciones patológicas relacionadas con inflamación crónica (trastornos autoinmunes y obesidad) e infección, lo cual puede contribuir a la mayor prevalencia de deficiencia de hierro en poblaciones con estas patologías (Hurrell y Egli, 2010; Beck y Coad, 2017). Por otro lado, en condiciones de hipoxia, cuando los niveles de hierro están restringidos o cuando es necesario amplificar el proceso de eritropoyesis, la expresión de hepcidina disminuye y el hierro se libera de los tejidos a través de FPN (Scheers, 2013; Tarifeño-Saldivia y col., 2018).

La expresión de DMT1 está regulada a nivel transcripcional negativamente por aumentos en la concentración de hierro y positivamente por agentes pro-inflamatorios y la hipoxia:

- En células intestinales (Caco-2) la transcripción del gen FPN y DMT1 disminuye cuando las células se incuban en presencia de cloruro férrico y aumentan en presencia de desferrioxamina (DFO) (Zoller y col., 2002).
- El aumento de la expresión de agentes proinflamatorios como LPS, las citocinas TNF α y IFN- γ , y el factor de transcripción NF- κ B, inducen la expresión de DMT1. La isoforma 1B de DMT1 tiene un elemento sensible a NF- κ B en su región no codificante 5'.
- El factor 2 inducible por hipoxia HIF2 α , induce la expresión de DMT1-1A y DcytB, y se degrada en respuesta al ascorbato, hierro y oxígeno (Scheers, 2013). En un estudio en ratones, se encontró que tanto la isoforma 1A de DMT1 como DcytB contienen elementos sensibles a HIF (HRE) en sus respectivos genes reguladores elementos de respuesta Hif-2 α y la transcripción mediada por HIF2 α fue inducida por una dieta baja en hierro (Shah y col., 2009). HIF2 α

también induce la expresión de ferroportina en ratones con deficiencia de hierro (Taylor y col., 2011).

1.3.3 Regulación traduccional

Las investigaciones realizadas hasta la fecha indican que la regulación traduccional posee un tiempo de respuesta de 1,5–3 horas (Frazer y col., 2003).

En los vertebrados, los niveles celulares de hierro se controlan después de la transcripción a través de la actividad de las proteínas reguladoras del hierro (IRPs: *Iron Regulatory Proteins*) citosólicas. Estas proteínas se unen a secuencias de ARNm conocidas como elementos sensibles al hierro (IRE: *Iron Responsive Elements*) (Aguirre y col., 2005; Arredondo y Núñez, 2005). El sitio de unión a la IRP se produce en las regiones no codificantes 3' o 5' (3'-UTR o 5'-UTR) de los ARNm que codifican las proteínas involucradas en la captación, el almacenamiento y el flujo de salida del hierro desde el enterocito (Eisenstein y Ross, 2003; Wallander y col., 2006; Herrera y col., 2015).

Hay dos formas de IRP, IRP1 e IRP2, ambas son proteínas de unión a ARNm. IRP2 es estructuralmente similar a la IRP1 pero carece del grupo Fe-S (Herrera y col., 2015). IRP1 es más importante que IRP2 en la regulación de la homeostasis de hierro en tejidos como la grasa marrón y el riñón en el ratón (Meyron-Holtz y col., 2004).

Dos de las cuatro isoformas de DMT1 y una de las dos isoformas de ferroportina contienen la secuencia IRE en sus transcripciones de ARNm; por lo tanto, están bajo el control de los IRP (Hubert y Hentze, 2002; Zhang y col., 2009). La ferritina y FPN1A contienen una secuencia IRE dentro de la región no codificante 5'. En cambio, RTf, DMT1-1A/IRE(+) y DMT1-1B/IRE(+) poseen un IRE en la región no codificantes 3'. La formación de complejos IRP/IRE en la región 5'-UTR del ARNm inhibe la traducción del ARNm, mientras que la unión en la región 3'-UTR previene la degradación del ARNm por las ribonucleasas, promoviendo la traducción (Campillos y col., 2010).

Las actividades de IRP1 e IRP2 responden a los cambios en el hierro celular a través de diferentes mecanismos. Cuando los niveles celulares de hierro son bajos, las IRPs se unen a las secuencias IRE en la región 5'-UTR del ARNm de ferritina y FPN1A, bloqueando la traducción, y se unen también a las secuencias IRE de 3'-UTR del ARNm de RTf y DMT1, estabilizando los ARNm, lo que promueve la traducción de RTf y DMT1 y aumenta la absorción del hierro desde la BBM (Scheers, 2013). En condiciones repletas de hierro, los niveles elevados del cLIP estimulan la degradación proteasomal de IRP2, lo que aumenta los niveles de FPN1A y el flujo de hierro al torrente sanguíneo (Rouault y Maio, 2020). Además, en estas condiciones IRP1 se activa como aconitasa citosólica inactiva para la unión a IRE (Guo y col., 1995). IRP1 puede regularse por los niveles de hierro, pero también por efectores como el óxido nítrico, el peróxido de hidrógeno, la hipoxia, y la fosforilación (Arredondo y Núñez, 2005).

En las células intestinales Caco-2 con deficiencia de hierro, se observó un aumento en los niveles de IRP2 pero no de IRP1 (Scheers y Sandberg, 2014). En ratones con deficiencia de hierro, la unión al ARNm de IRP1 no aumenta a pesar de la activación de IRP2 (Meyron-Holtz y col., 2004). Existe evidencia de que los ratones *knock-out* para el gen de IRP2 nacen normales, pero en la edad adulta desarrollan un trastorno del movimiento caracterizado por ataxia, bradicinesia y temblor (LaVaute y col., 2001). En cambio, los ratones *knock-out* para el gen de IRP1 son normales con solo una ligera desregulación del metabolismo del hierro en el riñón y la grasa marrón (Meyron-Holtz y

col., 2004). Por lo tanto, IRP2 parece dominar la regulación fisiológica del metabolismo del hierro, mientras que IRP1 parece predominar en condiciones fisiopatológicas (Arredondo y Núñez, 2005).

1.3.4 Bloqueo de la mucosa

Un aspecto de la regulación que no se ajusta al período de tiempo que tarda en influir el estado corporal del hierro sobre la absorción de hierro, es el fenómeno del bloqueo de la mucosa (Frazer y col., 2003). El bloqueo de la mucosa es un mecanismo endocítico de respuesta rápida que se ha descrito como la capacidad de una dosis inicial de hierro ingerido para bloquear la absorción de una segunda dosis, lo cual permite a los enterocitos modular la absorción de hierro después de un desafío inicial de este metal para así evitar el exceso de su absorción (Crosby, 1966; Núñez, 2010).

Se ha reportado que después de un desafío inicial con hierro, la absorción de una segunda dosis de hierro disminuye en aproximadamente un 33 % en comparación con la primera dosis, y que el fenómeno del bloqueo de la mucosa tiene un tiempo de respuesta de 45 a 90 minutos, haciéndolo el mecanismo de regulación más rápido reportado hasta el momento (Crosby, 1966; Núñez, 2010). El efecto de bloqueo puede mantenerse de 3 a 9 horas en las células epiteliales (Frazer y col., 2003).

Diversas hipótesis han sido planteadas acerca de la causalidad del bloqueo de la mucosa, pues este fenómeno ha sido evidenciado en números experimentos, pero los mecanismos involucrados no se entienden completamente. La posible causa que ha cobrado más fuerza en los últimos años es la redistribución de proteínas transportadoras, específicamente de DMT1. Se ha informado que la alimentación de hierro (ambas formas iónicas) induce la rápida internalización de DMT1 en las células epiteliales intestinales, desde la BBM a las vesículas del compartimiento intracelular que contienen DMT1 unido con hierro (Ma y col., 2006b; Núñez, 2010; Núñez y col, 2010; Ma y col., 2018) y la translocación de Hp y FPN desde la BLM al compartimiento sub-apical (Núñez y col, 2010; Yeh y col., 2011). Esto traería como consecuencia una disminución en la capacidad de absorción de hierro. Además, se ha probado en una línea de células intestinales (Caco-2) que la alimentación con hierro en el medio apical no produce cambios en las tasas de síntesis o de degradación de DMT1; por lo tanto, los cambios en los porcentajes de DMT1 presente en cada compartimiento celular probablemente se deban a la presencia continua de hierro (Ma y col., 2002).

En un estudio reciente se determinó la cinética de la endocitosis DMT1-1A/IRE(+), mediante la biotilación selectiva de la membrana apical de las células Caco-2, donde se observó una drástica disminución de DMT1 en dicha membrana inducida por el desafío de hierro en el compartimiento apical y su posterior reinsertión (Esparza y col., 2015). En este estudio, se utilizaron tres formas de hierro, sulfato de amonio ferroso (FAS), ascorbato ferroso (Fe-Asc), y una fuente de Fe³⁺ (Fe-NTA: FeCl₃ y ácido nitrilotriacético), y las tres causaron la reubicación de DMT1 desde la membrana apical hacia dominios intracelulares, aunque con diferencias cinéticas, como puede observarse en la Figura 1.2. Luego del desafío de hierro, se observó un retorno de DMT1 a casi los niveles iniciales después de: 60 minutos para Fe-NTA, 45 minutos para FAS y 30 minutos para Fe-Asc. Además, se observó una segunda internalización de DMT1 después de 60–90 minutos del desafío con hierro.

En el duodeno de ratas se estudió, por medio del uso de microscopia confocal, el efecto que tiene la alimentación con hierro en la localización de DMT1 y FPN1, como se muestra en la [Figura 1.3](#) (Núñez, 2010). En condiciones de privación de hierro, DMT1-1A/IRE(+) se localizó predominantemente en la membrana apical de las microvellosidades, y se relocalizó drásticamente hasta los dominios basales luego de la alimentación con hierro ([Figura 1.3A](#)); FPN1 se localizó en el dominio basolateral, pero también se localizó considerablemente en el dominio apical antes del suministro de hierro, y luego de éste se dio una reducción de la FPN1 basolateral sin efecto aparente sobre la FPN1 apical ([Figura 1.3B](#)).

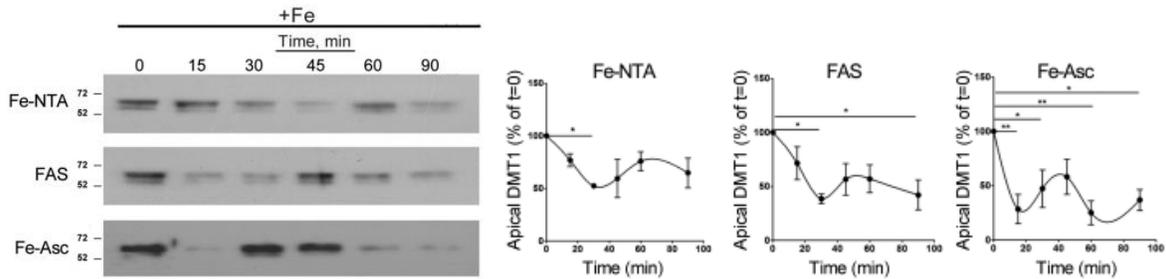


Figura 1.2. Cinética de internalización de DMT1-1A/IRE(+) inducida por el desafío de 20 μ M de Fe-NTA, sulfato de amonio ferroso (FAS) o ascorbato ferroso (Fe-Asc). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Tomada de [Esparza y col. \(2015\)](#).

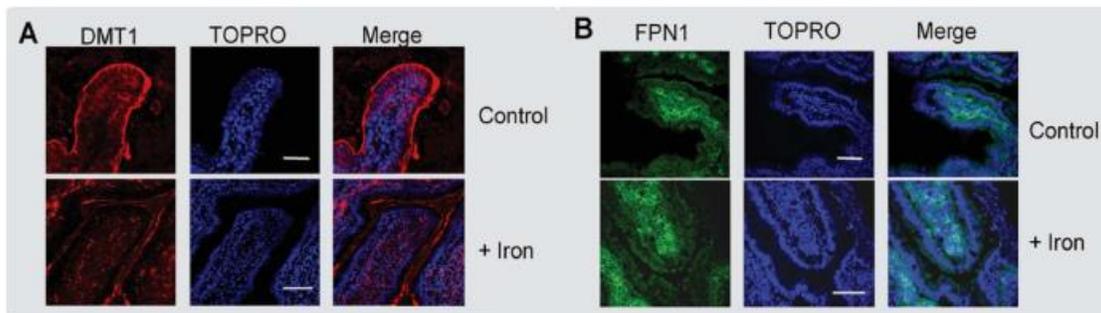


Figura 1.3. Efecto de la alimentación con 20 mg de FeSO_4 sobre la localización en el intestino de rata de los transportadores DMT1 y FPN1. **A)** DMT1 (rojo), **B)** FPN1 (verde). El efecto en la relocalización celular se observó luego de 3,5 horas de la alimentación con hierro.

Tomada de [Núñez, \(2010\)](#).

1.4 Potenciadores e inhibidores dietéticos del proceso de absorción de hierro

El proceso de absorción de hierro no solo es fuertemente influenciado por el estado corporal del hierro, sino también por factores dietéticos que pueden clasificarse como potenciadores o inhibidores ([Benkhedda y col., 2010](#)), y los conocidos hasta ahora se describen a continuación.

1.4.1 Potenciadores dietéticos del proceso de absorción de hierro

- **Ácido ascórbico (vitamina C o l-ascorbato)**

DcytB cataliza la reducción de hierro férrico a ferroso para estimular la absorción de hierro ([Yamaji y col., 2001](#); [Sharp y Srail, 2007](#); [Latunde-Dada y col., 2008](#)). Sin embargo,

esta reducción también puede producirse por factores dietéticos, siendo el factor más importante el ácido ascórbico o vitamina C, el cual es un agente reductor de un electrón capaz de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} y evitar la formación de complejos de hierro insolubles inclusive en medios con pH más básicos como el duodeno (Hallberg y col., 1989; Teucher y col., 2004). Además, el ácido ascórbico es un antioxidante primario para las células capaz de neutralizar muchas especies oxidantes altamente reactivas (Chepda y col., 2001; Smirnov, 2018).

La vitamina C es típicamente abundante en las células de vertebrados y en los fluidos extracelulares, siendo su concentración típica en el plasma humano de individuos no suplementados de 40 a 60 μM (Lane y col., 2013). Se ha demostrado que la presencia de ácido ascórbico aumenta la captación de hierro no hemo de forma dependiente de la dosis *in vitro* (Han y col., 1995; Kalgaonkar y Lonnerdal, 2008), aumenta la absorción de hierro en estudios humanos (Olivares y col., 1997; López y Martos, 2004; Moretti y col., 2006), y permite superar el efecto negativo sobre la absorción de hierro de todos los inhibidores, que incluyen el fitato, los polifenoles, el calcio y las proteínas en los productos lácteos (Hurrell y Egli, 2010). Por otro lado, el ácido ascórbico tiene poco efecto sobre la absorción del hierro hemo (Villaruel y col., 2011).

A diferencia de la mayoría de los animales, una pequeña proporción de especies de vertebrados, incluidos los humanos y otros primates *haplorhine*, son incapaces de la síntesis de ácido ascórbico y desarrollan escorbuto si se les priva de esta vitamina, que deben adquirir desde la dieta (alimentos cítricos, vegetales de hoja verde oscuro, pimientos, melones y fresas) (Mandl y col., 2009; Kuiper y Vissers, 2014; Smirnov, 2018). Esto lleva a pensar que se requieren más estudios para confirmar que los hallazgos en ratas se pueden extrapolar a humanos dado que los roedores sintetizan de forma endógena el ácido ascórbico y se ven menos afectados por los inhibidores dietéticos de la absorción de hierro que los humanos (Sharp y Srai, 2007; Perfecto y col., 2017).

En un estudio con humanos, cuando se incluyó un vaso de jugo de naranja en un desayuno, la absorción de hierro aumentó 2,5 veces (Teucher y col., 2004). Un estudio en mujeres indias mostró que cuando el ácido ascórbico se agrega a la comida en una relación molar al hierro de 2:1 y de 4:1, aumenta la absorción de hierro en un grupo con IDA (en un 291 % y 350 % respectivamente) y en un grupo control (en un 270 % y 343 % respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la absorción de hierro entre los grupos, lo que indicó que es probable que el efecto potenciador del ácido ascórbico sea independiente del estado del hierro (Thankachan y col., 2008).

Se ha proporcionado evidencia de que el ascorbato incrementó la captación de hierro férrico (FeCl_3) o ferroso (FeSO_4) en las células Caco-2 de una manera dependiente de la concentración, con una diferencia significativa entre la captación y la reducción de hierro (Glahn y col., 1998; García-Casal y col., 2000; Thumser y col., 2010; Zödl y col., 2010). El problema de suministrar ascorbato a las células cultivadas se debe a su autooxidación, que es particularmente pronunciada si existen iones de metales de transición no complejos como iones de cobre o hierro en el cultivo (Chepda y col., 2001; Frikke-Schmidt y Lykkesfeldt, 2010). Varios investigadores observaron que la peroxidación lipídica depende en gran medida de la valencia del hierro, ya que aumenta significativamente cuando se añade ácido ascórbico a las células Caco-2 incubadas con hierro ferroso, y no con hierro o ascorbato solo (Zödl y col., 2010; Courtois y col., 2000).

El efecto a largo plazo del ácido ascórbico sobre el estado del hierro en el cuerpo es, sin embargo, menos claro. En varios estudios, se ha observado que la adición de altas

cantidades de ácido ascórbico a las dietas diarias durante un largo período no ha logrado aumentar los niveles de ferritina, aunque las medidas de absorción de una sola comida han indicado en los mismos sujetos que el ácido ascórbico aumenta la absorción de hierro (Hunt y col., 1994; Teucher y col., 2004).

- ***Carnes de res, pescados y aves***

La carne de res, de pescado y de las aves de corral, no solo proporcionan hierro hemo muy biodisponible, sino que también pueden estimular la absorción de la forma no hemo (Hallberg y col., 1979; Morris, 1983; Johnson y Walker, 1992). Varios estudios han reportado que la adición de carne a una comida a base de cereal resulta en una absorción de hierro no hemo aproximadamente 2–3 veces mayor, en comparación con la misma comida sin carne, aunque dicha comida contenga inhibidores de la absorción de hierro o sea reducida en ácido ascórbico (Hurrell y col., 2006; Zijp y col., 2000; Baech y col., 2003; Bach y col., 2005). Según los hallazgos del estudio de Zijp y col. (2000), se estimó que 1 g de carne proporciona un efecto potenciador de la absorción de hierro similar al de 1 mg de ácido ascórbico (Zijp y col., 2000; Sharma y col., 2003).

El aumento la biodisponibilidad del hierro no hemo debido al consumo de proteínas de origen muscular se conoce como "factor cárnico", pero el componente bioactivo de este factor aún no se ha identificado (Allen, 1997; Hurrell y col., 2006). La carne puede mejorar la absorción de hierro no hemo debido al efecto potenciador de los productos liberados por digestión de proteínas del tejido muscular sobre la absorción de hierro, como ciertos aminoácidos y particularmente los péptidos que contienen cisteína que, como el ácido ascórbico, podrían reducir el hierro férrico a ferroso y mantenerlo en un complejo soluble disponible para la absorción (Villarroya y col., 2011; Dasa y Abera, 2018). La explicación más probable es que los péptidos parcialmente digeridos de las proteínas musculares se unen al hierro a través de sus residuos de cisteína e histidina para formar complejos que son solubles y están disponibles para la absorción. Por otro lado, debe considerarse que los glicosaminoglicanos, el componente de carbohidratos en el tejido conectivo del tejido muscular, tienen cadenas laterales de sulfato y ácido carboxílico que, cargadas negativamente, podrían tener propiedades de unión al hierro (Hurrell y col., 2006).

Al igual que con el ácido ascórbico, ha sido difícil demostrar el efecto potenciador de la carne en múltiples comidas y estudios a largo plazo de la dieta (Hurrell y Egli, 2010).

- ***Alimentos con vitamina A y betacaroteno***

La vitamina A y los betacarotenoides pueden mejorar la absorción de hierro no hemo (Beck y Coad, 2017). Diferentes estudios muestran que los betacarotenos y la vitamina A previenen el efecto inhibitorio de los fitatos sobre la absorción de hierro, aunque el mecanismo no está dilucidado (Layrissey col., 1997; Walczyk y col., 2003). Un estudio con 100 personas que recibieron comidas a base de cereales, etiquetadas con ^{59}Fe o ^{55}Fe , determinó que la presencia de vitamina A aumentaba la absorción de hierro hasta en un 200 % para el arroz, 80 % para el trigo y 140 % para el maíz, y que la presencia betacaroteno en las comidas aumentó la absorción en más del 300 % para el arroz y 180 % para el trigo y el maíz (García-Casal y col., 1998).

La deficiencia de vitamina A, como la deficiencia de hierro, conduce a la anemia. La vitamina A puede afectar varias etapas del metabolismo del hierro, que incluyen la eritropoyesis y la liberación de hierro de las reservas de ferritina. Sin embargo, se ha

observado que el exceso de vitamina A disminuye significativamente la absorción de hierro (Hurrell y Egli, 2010).

1.4.2 Inhibidores dietéticos del proceso de absorción de hierro

- **Antiácidos**

Dada la dependencia del proceso de transporte de hierro a través de DMT1 con la concentración de protones, el tratamiento con antiácidos interfiere con la absorción de hierro ya que disminuye la disponibilidad de protones (Gunshin y col., 1997; Andrews, 2008).

- **Zinc y cobre**

La interacción entre el hierro, el cobre y el zinc durante el proceso de absorción de hierro puede explicarse por la unión competitiva a DMT1; por lo tanto, en teoría, existe una disminución de la biodisponibilidad recíproca entre estos microminerales (Gunshin y col., 1997).

Aunque el Zn^{2+} es un ligando para las isoformas 1A y 1B de hDMT1, solo se transporta de forma deficiente en relación con Fe^{2+} ; sin embargo, la preferencia por el Fe^{2+} sobre Zn^{2+} está más marcada para hDMT1 que para su homólogo en ratas (Mackenzie y col., 2007). Estudios realizados indican que, cuando se ingieren hierro y zinc juntos en relaciones Zn:Fe mayores a 5:1, la biodisponibilidad del hierro se disminuye hasta en un 56 %, pero este efecto no se observa cuando los metales se ingieren a la misma relación molar en una mezcla de alimentos (Whittaker, 1998).

Arredondo y Núñez, (2005) midieron los efectos del aumento de las concentraciones de zinc y cobre en la absorción de hierro en las células Caco-2, y demostraron que el cobre y zinc inhiben la captación de hierro, solos o en combinación en diferentes proporciones. Cuando los tres metales se administraron juntos (relación molar $^{55}Fe:Cu:Zn$ de 1:1:1), observaron que la absorción de hierro se inhibió aproximadamente un 40 %, y concluyeron que sus resultados apuntan a un riesgo potencial en la absorción y biodisponibilidad de hierro por la presencia de otros minerales en la dieta. Por otro lado, determinaron que cuando las células se incuban previamente con diferentes concentraciones de cobre o zinc, la captación de ^{55}Fe no se inhibe cuando se administra solo hierro, lo cual significa que la absorción de hierro es independientemente del estado intracelular de estos otros metales.

- **Fitato (hexakisfosfato de mioinositol)**

La absorción de hierro no hemo en humanos se ve afectada negativamente por los fitatos presentes en los alimentos de origen vegetal (Gunshin y col., 1997; Gaitán y col., 2011). Durante la digestión, la molécula de fitato puede cargarse negativamente, lo que indica un potencial para unir iones metálicos cargados positivamente como el hierro (Dasa y Abera, 2018). Las ratas tienen enzimas fitasas capaces de degradar el ácido fítico, lo que resulta en una mayor absorción de hierro en condiciones normales (Moslemi y col., 2018).

En las dietas basadas en plantas, el fitato es el principal inhibidor de la absorción de hierro. Brune y col. (1989) al examinar a vegetarianos y no vegetarianos, descubrieron que a largo plazo no había adaptación del ribete en cepillo intestinal ante una alta ingesta de fitato y concluyeron que las reservas de hierro satisfactorias en el grupo vegetariano se debieron a un alto consumo de ácidos orgánicos como el ácido ascórbico. El efecto

negativo del fitato sobre la absorción de hierro depende de la dosis y comienza a concentraciones muy bajas de 2 a 10 mg/comida (Hallberg y col., 1989; Hurrell y col., 1992). La relación molar de fitato a hierro debe ser preferiblemente < 0,4:1 para mejorar significativamente la absorción de hierro en comidas a base de legumbres que no contienen potenciadores de la absorción de hierro, o < 6:1 en comidas compuestas que contienen ácido ascórbico y carne como potenciadores (Hurrell, 2004; Tuntawiroon y col., 1991).

En un estudio con aislados de proteína de soja, la absorción de hierro aumentó 19 veces cuando la proteína se hidrolizó ampliamente con enzimas y se degradó el fitato. Los autores concluyeron que el fitato y un resto relacionado con la proteína contenida en la fracción de conglucina eran los principales inhibidores de la absorción de hierro en la proteína de soja (Lynch y col., 1994).

- **Compuestos polifenólicos**

Los polifenoles como el ácido fítico, los ácidos clorogénicos, los flavonoides monoméricos y los productos de polimerización de polifenol presentes en la dieta humana y que son especialmente abundantes en bebidas como café, vino tinto, cacao y los diferentes té de hierbas, reducen la absorción de hierro dependiendo de su cantidad (Hurrell y Egli, 2010). Durante la digestión, los compuestos fenólicos de los alimentos o bebidas se liberan y pueden formar complejos con el hierro en el lumen intestinal, por lo que el hierro no estaría disponible para su absorción (Dasa y Abera, 2018).

Tanto la cantidad de polifenoles, así como el tipo del mismo, influye en la absorción de hierro. En un estudio con especias se encontró que el chile, pero no la cúrcuma, inhibe la absorción de hierro, aunque la cúrcuma contiene más polifenoles que el chile (Tuntipopipat y col., 2006). La inhibición del té negro sobre la absorción de hierro se encuentra entre 79 y 94 %, y el café tiene aproximadamente la mitad del efecto inhibitor del té negro (Dasa y Abera, 2018). En cantidades comparables, se ha demostrado que los polifenoles del té negro son más inhibidores que los polifenoles del té de hierbas y el vino (Hurrell y col., 1999; Cook y col., 1995). Tuntawiroon y col. (1991) encontraron que una porción de *yod kratin*, una verdura con alto contenido de fenoles, comúnmente consumida en Tailandia, reduce la absorción de hierro en casi un 90 %. Gaur y Miller (2015) mostraron mediante el método de digestión *in vitro* que el té y la leche cuando se toman juntos reducen significativamente la concentración de hierro dializable ($19,83 \pm 1,71$ % del hierro total en el tratamiento) ($5mM$ de $FeCl_3$) en comparación con el té o la leche sola ($30,8 \pm 2,03$ % y $24,72 \pm 3,73$ %, respectivamente).

- **Proteínas animales**

Las proteínas animales, como las proteínas de la leche, las proteínas del huevo y la albúmina inhiben la absorción de hierro (Monsen y Cook, 1976; Cook y col., 1981).

En un estudio se demostró que la clara de huevo y las dos fracciones principales de proteínas de la leche bovina, la caseína y el suero, inhiben la absorción de hierro en humanos (Hurrell y col., 1989). La caseína contiene por grupos de fosfoserina, que unen cationes como el hierro con alta afinidad, impidiendo su absorción (Yeung y col., 2001). Por otro lado, la α -lactoalbúmina se une fuertemente a un ion calcio y tiene otro sitio de unión que podría unir calcio u otros cationes divalentes, incluido el hierro (Kelleher y col., 2003). Otra explicación dada por los investigadores sobre inhibición observada es que los niveles de calcio en la leche bovina (altos en el suero) pueden haber tenido efectos

adicionales sobre la absorción de hierro (Hurrell y col., 1989). El secuestro de hierro libre en el lumen intestinal es probablemente importante para proteger al becerro del crecimiento excesivo de patógenos bacterianos, y se ha atribuido al alto nivel de calcio de la leche de vaca (Beck y Coad, 2017). El posible efecto inhibitor del calcio se analiza más detalladamente en la siguiente sección.

1.5 El Calcio en la absorción de Hierro

El calcio es el mineral más abundante en el cuerpo, y en el sistema circulatorio, líquido extracelular, músculo y otros tejidos tiene un rol esencial para mediar la contracción y vasodilatación vascular, la función muscular, la coagulación de la sangre, la transmisión neuromuscular del impulso nervioso, la señalización intracelular y la secreción hormonal (Institute of Medicine, 2011; Heaney, 2015).

En el adulto casi todo el calcio corporal (98 %) se almacena en el tejido óseo, principalmente en forma de cristales de hidroxipatita, y se usa como reservorio y fuente de calcio para las necesidades metabólicas, manteniendo así la homeostasis del calcio (Institute of Medicine, 2011). A diferencia de los dientes, el hueso experimenta una remodelación continua, con reabsorción constante y depósito de calcio en el hueso nuevo, para cambiar el tamaño de los huesos durante el crecimiento, reparar el daño, mantener los niveles de calcio sérico y proporcionar una fuente de otros minerales (Weaver, 2020). Apenas el 0,1 % del calcio corporal se halla en el líquido extracelular, donde aproximadamente el 50 % del calcio sérico total está unido a proteínas (principalmente albúmina), 10 % está unido a otros elementos (citrato, fosfato, lactato, heparina, bicarbonato, sulfato) y 40 % en forma libre o ionizada (Besarab y col., 1981). En las células eucariotas, la concentración de calcio citosólico suele estar entre 0,1 y 100 nM, mientras que la concentración de calcio extracelular es aproximadamente de 1000 a 10000 veces mayor (Wang y col., 2005; Milo y Phillips, 2015).

Las dos formas más comunes de calcio en los suplementos dietéticos son el carbonato de calcio y el citrato de calcio (Institute of Medicine, 2011). En personas con niveles bajos de ácido estomacal, la tasa de solubilidad del carbonato de calcio es más baja, lo que podría reducir la absorción de calcio desde este suplemento (Weaver y Heaney, 2014); en cambio, el citrato de calcio depende menos del ácido estomacal para su absorción, pero su biodisponibilidad es menor y es más costoso (Recker, 1985; Straub, 2007). El porcentaje de calcio absorbido de los suplementos, al igual que el de los alimentos, depende no solo de la fuente de calcio sino también de la cantidad total de calcio elemental consumido en una sola vez; a medida que aumenta la cantidad, el porcentaje absorbido disminuye.

La ingesta adecuada de calcio dietético es importante para garantizar la mineralización ósea, para la prevención del raquitismo en los niños y para la prevención de la pérdida ósea a largo plazo (Jaramillo y col., 2015). Sin embargo, se ha estimado que una gran proporción de adolescentes y adultos, especialmente las mujeres, no alcanzan las recomendaciones dietéticas actuales para el calcio (Harris, 2002; Weaver y Heaney, 2006). La ingesta dietética diaria recomendada para adultos de 19-70 años es de 1000 mg/día, y se estableció considerando la cantidad necesaria para favorecer el mantenimiento óseo y el equilibrio neutro del calcio; para los lactantes de 0 a 12 meses, la ingesta recomendada se estableció según la ingesta media de calcio en lactantes sanos alimentados con leche materna, que es de 200-260 mg/día; para niños de 1-8 años, se recomienda ingerir 700-1000

mg/día y para los adolescentes esta recomendación es de 1300 mg/día (Institute of Medicine, 2011). Un análisis de la ingesta de calcio en hombres y mujeres de 20 países mostró que, según el grupo de edad, entre 10–40 % de los hombres y 40–50 % de las mujeres no consumen su requerimiento diario de calcio (Weaver y Heaney, 2006). Un análisis de los datos de 2007-2010 de la Encuesta nacional de examen de salud y nutrición (NHANES) encontró que 39 % de todas las personas mayores de 4 años consumen menos calcio de los alimentos y suplementos que el requerimiento promedio estimado (Wallace y col., 2014).

La deficiencia de calcio (nivel de calcio sérico inferior a 8,5 mg/dL (o 2,12 mmol/L)) puede reducir la fortaleza de los huesos y provocar osteoporosis, que se caracteriza por huesos frágiles y un mayor riesgo de caídas (Institute of Medicine, 2011). La deficiencia de calcio también puede causar que los niños no alcancen su masa ósea máxima genéticamente predeterminada de forma irreversible, lo que puede conducir a la osteoporosis y al riesgo de fracturas óseas más adelante en la vida (Benkhedda y col., 2010; Walczyk y col., 2014). Otro efecto de la deficiencia crónica de calcio es la osteomalacia, o mineralización ósea defectuosa y ablandamiento óseo, que puede ocurrir en adultos y niños (Institute of Medicine, 2011). En vista de que la ingesta de calcio se considera importante para la prevenir pérdida ósea y la osteoporosis, a menudo se recomienda la administración de suplementos de calcio con las comidas para mejorar la absorción de calcio (Mølgaard y col., 2005; Beck y Coad, 2017).

La hipercalcemia (niveles séricos de calcio superiores a 10,5 mg/dL (o 2,63 mmol/L)), suele ser el resultado de cáncer, hiperparatiroidismo primario y otras condiciones, y puede causar un tono muscular deficiente, insuficiencia renal, hipofosfatemia, estreñimiento, náuseas, pérdida de peso, fatiga, poliuria, arritmias cardíacas y un mayor riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular (Institute of Medicine, 2011; Weaver, 2020; Asemi y col., 2015).

El calcio de los alimentos y suplementos dietéticos se absorbe por transporte activo (transcelularmente) y por difusión pasiva (paracelularmente) a través de la mucosa intestinal (Institute of Medicine, 2011; Weaver y Heaney, 2014; Herrera y col., 2015; Fullmer, 1992; Pu y col., 2016). El transporte activo, también denominado mecanismo saturable, representa la mayor parte de la absorción de calcio cuando su ingesta es baja o moderada, y ocurre principalmente en el duodeno, donde el receptor intestinal de vitamina D (VDR) se expresa en la concentración más alta (Institute of Medicine, 2011; Weaver y Heaney, 2014). El transporte transcelular de Ca^{2+} consiste de 3 pasos: (1) entrada apical de Ca^{2+} a través del transportador de calcio llamado canal de cationes de potencial receptor transitorio, miembro de la familia vaniloide 6 o TRPV6 (*transient receptor potential cation channel, vanilloid family member 6*), ubicado en la membrana apical, (2) difusión citosólica del calcio luego de su unión a calbindina-D9k, proteína fijadora de calcio intracelular, y (3) expulsión del calcio desde la célula al torrente sanguíneo a través de la membrana basolateral por la Ca^{2+} -ATPasa 1b de la membrana plasmática (PMCA1b, *plasma membrane Ca^{2+} ATPase 1b*) (que mueve el calcio en contra de un gradiente de concentración) y el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) (Pérez y col., 2008; Khanal y Nemere, 2008; Van de Graaf y col., 2004; Van de Graaf y col., 2006; Christakos y col., 2011; Cai y col., 1993; Johnson y Kumar, 1994). El calcitriol (1,25(OH)₂D₃, forma activa de la vitamina D) estimula los pasos individuales del transporte transcelular de calcio, por lo que esta vía de absorción de calcio también denominada mecanismo de transporte mediado por vitamina D (Peng y col., 1999). Las moléculas de calcitriol se unen a sus

receptores (VDR), y el complejo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR interactúa con secuencias de ARNm específicas que inducen la transcripción y aumentan los niveles de expresión de TRPV5, TRPV6, calbindina-D9k, VDR y PMCA1b (Li y col., 1993; Xue y Fleet, 2009). Por otro lado, la difusión pasiva, es una vía no saturable e independiente de la energía, que implica el movimiento de calcio a través de uniones estrechas de los enterocitos y depende de los gradientes electroquímicos luminal:serosal (Pu y col., 2016). La difusión pasiva ocurre más fácilmente durante las ingestas altas de calcio, es decir, cuando las concentraciones lumbinales son altas, y puede ocurrir a lo largo del intestino (Ireland y Fordtran, 1973; Institute of Medicine, 2011; Weaver y Heaney, 2014). Sin embargo, la permeabilidad de cada segmento intestinal determina las tasas de difusión pasiva. La mayor difusión de calcio se produce en el duodeno, el yeyuno y el íleon (Weaver y Heaney, 2006). El calcitriol regula el transporte paracelular de calcio al suprimir la expresión de claudina 3, acuaporina 8, cadherina 17 y RhoA, mejorando así la permeabilidad de las uniones estrechas (Kutuzova y DeLuca, 2004; Christakos, 2012).

El consumo de suplementos de calcio, así como de altas concentraciones del este micronutriente desde la dieta, causan preocupación debido al posible efecto inhibitor del calcio sobre la absorción de hierro hemo y no hemo en humanos, especialmente en los grupos poblacionales que presentan alteraciones en sus niveles corporales de hierro y/o de calcio (Roughead y col., 2005; Gaitan y col., 2011; Ríos-Castillo y col., 2014; Candia y col., 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora al analizar el efecto del calcio sobre la absorción o la biodisponibilidad de hierro han sido contradictorios, probablemente debido al uso de diferentes compuestos de hierro y calcio, la composición de las comidas o suplementos (consumo de hierro y calcio con y sin alimentos), uso de diferentes técnicas y metodologías de medición del efecto del calcio, entre otros aspectos. Esto hace que la interacción entre el calcio y el hierro sea de particular importancia, ya que además del posible efecto inhibitorio del calcio sobre la absorción de hierro hemo y no hemo, estos micronutrientes son esenciales para el normal desarrollo de las funciones biológicas en los seres humanos (Hofer y col., 2008; Cassat y Skaar, 2013; Jaramillo y col., 2015). Un resumen de las principales investigaciones que han estudiado la interacción entre el hierro y el calcio hasta la fecha se presenta a continuación:

- Chapman y Campbell (1957) alimentaron a 10 ratas anémicas (5 machos y 5 hembras) durante períodos de 10 semanas con dietas formadas por un 80 % de pan, al que se le añadió harina de huesos, carbonato de calcio, lactato de calcio, cloruro de calcio, fosfato disódico o hexametáfosfato de sodio comercial. Al final del experimento descubrieron que cada una de las sales de calcio interfirió con la utilización del hierro como lo reflejaron las reservas de hierro en el hígado, la regeneración de hemoglobina y el aumento del peso del corazón, y propusieron que el alto nivel de captación de calcio por los enterocitos había generado un "bloqueo de la mucosa" que impedía la captación de hierro.

- Monsen y Cook (1976) utilizando el método del radioisótopo dual, evaluaron en 34 sujetos adultos el efecto de agregar calcio y fósforo, en forma de fosfato de calcio (CaHPO_4) y fosfato dipotásico (K_2HPO_4), sobre la absorción de hierro no hemo proveniente de una comida que contenía o no carne de res, y encontraron que la absorción se redujo significativamente (62 % y 71 % respectivamente) con la adición combinada de calcio y fosfato, pero no encontraron ningún efecto del calcio o del fósforo individualmente, por lo que sugirieron que al agregar estos metales juntos se forme un

complejo de calcio-fosfato-hierro que produce el efecto inhibitorio del proceso de absorción.

– Barton y col. (1983) demostraron que al añadir CaCl_2 a la dieta de ratas con deficiencia de hierro, el calcio inhibió la absorción de hierro al retrasar la captación intestinal de hierro. Las ratas alimentadas con una dieta rica en calcio y en hierro agotaron sus reservas de hierro, mientras que las alimentadas con una dieta alta en calcio con un contenido marginal de hierro desarrollaron anemia por deficiencia de hierro.

– Dawson-Hughes y col. (1986) observaron en mujeres posmenopáusicas que suplementar un desayuno que ya contenía 227 mg de calcio con 500 mg de carbonato de calcio o hidroxapatita, redujo la absorción de hierro no hemo en un 43 % y 46 %, respectivamente, en comparación con un desayuno sin suplemento de calcio.

– Deehr y col. (1990) en un estudio con 19 mujeres posmenopáusicas con estado de hierro normal, mostraron que la retención de ^{59}Fe en todo el cuerpo proveniente de una comida tomada luego de un ayuno nocturno, se redujo significativamente por la ingestión de 500 mg de calcio como leche (60 %) o como tabletas de citrato-malato de calcio (CCM) (30 %), pero esta reducción no se observó cuando se adicionó jugo de naranja a la comida. Este indica que cualquier efecto inhibitorio del calcio se superó por el alto contenido de ácido cítrico y ácido ascórbico del jugo de naranja, potenciadores conocidos de la absorción de hierro.

– Cook y col. (1991) investigaron el efecto de diferentes sales de calcio en la absorción de hierro en personas voluntarias con reservas bajas o normales de hierro, y encontraron que 600 mg de calcio (como citrato o fosfato) tomados con 18 mg de hierro como FeSO_4 sin alimentos (solo con agua) o con una hamburguesa, causan una inhibición promedio del 44 % (rango 10–65 %) de la absorción de hierro no hemo cuando se ingirieron con el estómago vacío; sin embargo, no observaron este efecto cuando el calcio lo proporcionaron como carbonato, mostrando así que el tipo de sal de calcio utilizada puede determinar el efecto inhibitorio. Además, encontraron un mayor efecto inhibitorio del calcio de las comidas individuales que de las dietas enteras, y sugirieron que posiblemente en los experimentos de dieta completa, los alimentos residuales en el intestino puedan moderar el efecto de los inhibidores y potenciadores presentes en partes individuales de la dieta. Por otro lado, encontraron que el efecto inhibitorio del calcio sobre la absorción de hierro se modifica por el estado corporal del hierro, ya que en los voluntarios con reservas normales de hierro el calcio causó una disminución en la absorción de hierro 9 % mayor que la observada en el grupo de individuos con bajas reservas de hierro.

– Hallberg y col. (1991) mostraron que agregar 165 mg de calcio como leche o queso a panecillos de trigo (que contienen 25 mg de fitato y 10 mg de calcio), reduce la absorción de hierro no hemo en un 57 % y 46 %, respectivamente, y que no se observa ningún efecto inhibitorio adicional cuando se agregan más de 300 mg de calcio por comida. Luego, Hallberg y col. (1992) añadieron leche (215 mg de calcio) a una hamburguesa (15 mg de calcio), queso (595 mg de calcio) a una pizza (55 mg de calcio) o un batido de leche (315 mg de calcio) a una hamburguesa (80 mg de calcio), y observaron que esto redujo la absorción de hierro no hemo en 63 %, 64 % y 46 %, respectivamente. Posteriormente, Hallberg y col. (1993) encontraron que 165 mg de cloruro de calcio disminuyeron la absorción del hierro hemo en hamburguesas y panecillos de trigo en un 41 % y 48 %, respectivamente, que es similar a la que obtuvieron para el hierro no hemo. Basados en sus resultados, estos investigadores propusieron que, debido a que la inhibición de calcio

probablemente ocurre en los pasos finales del transporte de hierro desde las células de la mucosa intestinal al plasma, después de que las dos formas de hierro hayan ingresado en un grupo común de hierro celular. Sin embargo, [Gaitán y col. \(2011b\)](#) señalan que [Hallberg y col.](#) no aislaron el efecto del calcio del de otros componentes de la dieta, porque se detectaron en estudios de una sola comida.

– [Galan y col. \(1991\)](#) no observaron ningún efecto significativo sobre la absorción de hierro no hemo cuando se agregaron 150 ml de leche (172 mg de calcio) o 125 g de yogur (233 mg de calcio) a una comida que contenía carne, queso, papas fritas, zanahorias, manzana, pan y agua (320 mg de calcio). Sin embargo, posiblemente la ausencia del efecto inhibitorio del calcio se debió a la alta concentración de calcio que tenía la comida inicialmente, o a la presencia de carne capaz de contrarrestar dicho efecto.

– [Sokoll y Dawson-Hughes \(1992\)](#), durante un período de 12 semanas, determinaron que el consumo diario de 1000 mg de carbonato de calcio con las comidas no parece ser perjudicial para el estado y las reservas de hierro corporal en mujeres sanas premenopáusicas. Sin embargo, todas las mujeres del estudio tenían altas ingestas autoseleccionadas de ácido ascórbico, el cual pudo haber compensado cualquier efecto adverso de los suplementos de calcio.

– [Gleerup y col. \(1993\)](#), en un estudio en humanos, encontraron que 340 mg de calcio (como leche o queso) administrados 2 o 4 h antes de una comida (hamburguesa), no tenía ningún efecto inhibitorio sobre la absorción de hierro no hemo. Posteriormente, [Gleerup y col. \(1995\)](#) observaron durante un período de 10 días que 21 mujeres sanas (entre 21–44 años) absorbieron 30–50 % más de hierro cuando consumieron la leche o el queso (937 mg de calcio/día) por separado de las comidas principales en comparación con el consumo de la misma cantidad de calcio cuando se distribuyó de manera uniforme en las 4 comidas. Concluyeron que una redistribución de la ingesta diaria de calcio a las comidas que tiene un contenido menor de hierro mejoraría la nutrición de hierro.

– [Wienk y col. \(1996\)](#) evaluaron la biodisponibilidad de hierro en ratas con deficiencia de hierro alimentadas con dietas con hierro con 6,2 o 25,0 g de carbonato de calcio/kg durante 14 días, encontrando que la dieta alta en calcio redujo significativamente la retención de hierro, la reposición de hemoglobina y el contenido de hierro en el hígado y el bazo. Los autores sugirieron que una alta ingesta de CaCO₃ en ratas con anemia disminuye la captación de hierro en el enterocito y/o reduce la exportación de hierro desde la membrana basolateral del enterocito al plasma.

– [Minihane y Fairweather-Tait \(1998\)](#), usando isótopos estables y monitoreo fecal, observaron una reducción del 70 % en la absorción de hierro no hemo en un estudio de un día con la adición de 400 mg de calcio como carbonato de calcio en el desayuno, almuerzo y cena (con comidas que contenían menos de 320 mg de calcio), en comparación con un día en que no se agregó calcio. Sin embargo, también encontraron que el estado del hierro (hemoglobina, ferritina sérica o receptores de transferrina) no cambió cuando los 400 mg de calcio se administraron tres veces al día (1200 mg por día) durante 6 meses a 24 hombres y mujeres, en comparación con el grupo de control no suplementado. Los autores sugieren que este hallazgo indica que existe una adaptación fisiológica a un aumento en la ingesta de calcio para compensar las variaciones en la absorción y disponibilidad de hierro.

– [Wauben y Atkinson \(1999\)](#) alimentaron lechones lactantes con un estado de hierro marginal con una fórmula líquida fortificada para un grupo con 4,67 g/L de calcio como fosfato de glicerol de calcio durante dos semanas, y evaluaron la absorción de hierro

radiomarcado (^{59}Fe). Los lechones con la dieta alta en calcio tuvieron una absorción de hierro, una retención de hierro en los órganos y un estado corporal de hierro similar a los lechones que recibieron la fórmula normal (2,0 g/L de calcio), lo que demuestra que los lechones se adaptaron a la dieta alta en calcio y el estado del hierro no se vio comprometido por presencia de altos niveles de calcio. Los autores descubrieron que el alto contenido de calcio inhibía la unión de ^{59}Fe a las vesículas de la BBM, y que esto era similar en los dos grupos de lechones, por lo que el calcio de la fórmula sin fortificar también podría inhibir la absorción de hierro.

– [Abrams y col. \(2001\)](#) dieron a niños de 6 a 9 años una barra de cereal que contenía 39 o 156 mg de calcio respectivamente, en el desayuno o en la cena de una dieta que contenía en ~100 mg de ácido ascórbico por día, y no encontraron ninguna influencia del calcio sobre absorción de hierro. La ausencia de dicha influencia posiblemente se debió al efecto potenciador de la absorción de hierro del ácido ascórbico.

– [Grinder-Pedersen y col. \(2004\)](#), en un estudio de 4 días con 14 mujeres (21–34 años) con bajas reservas de hierro, no encontraron diferencias significativas en la absorción de hierro no hemo ($^{59}\text{FeCl}_3$) entre una dieta básica con un bajo contenido de calcio (224 mg de calcio por día) y la misma dieta suplementada con un vaso de leche servida en cada comida (826 mg de calcio por día), con lactato de calcio (802 mg de calcio por día) o con un aislado mineral de leche que contiene calcio (801 mg de calcio por día). Todas las dietas proporcionaron 13,2 mg de hierro por día y cada comida contenía menos de 90 mg de calcio, lo que indica que la ausencia del efecto inhibitorio no se debería a una concentración saturable de calcio. Sin embargo, [Hallberg y col. \(1991\)](#) reportaron que 40 mg como cloruro de calcio fueron suficientes para reducir la absorción de hierro.

– [Mølgaard y col. \(2005\)](#) determinaron que la suplementación diaria por 1 año con 500 mg calcio tomados en la cena no tuvieron efecto negativo sobre el estado del hierro (hemoglobina, ferritina sérica y receptores de transferrina) de un grupo de adolescentes alrededor de la menarquia (12 a 14 años). Plantean que posiblemente se podría obtener un mayor potencial de inhibición del hierro distribuyendo la cantidad total de 500 mg/día de calcio entre las comidas diarias. Por otro lado, en este estudio el grupo que recibió el placebo tenía un estado corporal de hierro menor que el grupo que recibió el suplemento de calcio; por lo tanto, si el efecto de los potenciadores/inhibidores de la absorción de hierro es más pronunciado cuanto menor sea el estado corporal del hierro, entonces el efecto del calcio pudo subestimarse en este estudio.

– [Rosado y col. \(2005\)](#) no observaron ningún efecto significativo del calcio sobre la absorción de hierro cuando agregaron 250 ml de leche (274 mg de calcio) o 150 g de yogur (182 mg de calcio) a los desayunos y almuerzos de una dieta a base de plantas, que ya contenían 218 mg de calcio. Este estudio se realizó con un grupo de 48 mujeres mexicanas ($30,9 \pm 5,7$ años) que habitualmente consumían una dieta basada en plantas, la cuales fueron asignadas a uno de tres grupos de estudio: 1) consumo de la dieta típica mexicana rural, 2) consumo de esa dieta con leche agregada, o 3) consumo de esa dieta con yogur, durante 13 días. En este estudio, el alto contenido de fitato de la dieta basada en plantas, pudo minimizar el efecto del calcio en la biodisponibilidad de hierro.

– [Roughead y col. \(2005\)](#) desarrollaron dos experimentos en humanos para probar comidas basales con baja biodisponibilidad de hierro y 360 mg de calcio (n=15) o con alta biodisponibilidad de hierro y 60 mg de calcio (n=12), utilizando el lavado intestinal completo y el recuento de todo el cuerpo, para medir la absorción inicial (8 h) y la retención

(2 semanas) de hierro hemo (^{55}Fe como hemoglobina de conejo) y no hemo (^{59}Fe como FeCl_3) con y sin un suplemento de calcio (450 mg como citrato). El calcio agregado redujo el hierro total absorbido de las comidas de baja y alta biodisponibilidad en aproximadamente 25 % al reducir la captación inicial de hierro hemo de 49 % a ~40 % en ambas comidas, sin afectar la transferencia serosa de ninguna de las formas de hierro. El calcio también redujo la captación de hierro no hemo de 13 % a 10 %. Un hallazgo interesante en este estudio fue que la transferencia serosa de las dos formas de hierro fue diferente, lo cual indicaría que el hierro hemo y no hemo no entraron en un grupo de absorción común dentro de las 8 h después de ingerir una comida. Los hallazgos de este estudio no respaldan el mecanismo propuesto por [Hallberg y col. \(1993\)](#) para explicar el efecto inhibitorio del calcio.

– [Benkhedda y col. \(2010\)](#) evaluaron el efecto de 500 mg de CaCO_3 sobre la absorción de hierro no hemo (FeSO_4), utilizando la metodología de una sola comida (desayuno con panecillos que contienen 19 mg de calcio) en un grupo de 13 mujeres premenopáusicas con estado marginal de hierro preexistente. Sus resultados muestran que el calcio redujo la absorción de hierro en un 53 %. Por otro lado, observaron que la magnitud del efecto del calcio varió considerablemente entre los participantes, lo que implica que la preselección de los participantes en el estudio no pareció reducir la variabilidad interindividual en la absorción de hierro medida. Los autores sugieren que los factores fisiológicos o genéticos adicionales, además de los niveles de las reservas corporales de hierro y el tipo de dieta consumida, tienen fuertes influencias en la absorción de hierro en individuos con reservas similares de hierro corporal.

– [Lönnerdal \(2010\)](#) incubó células Caco-2, cultivadas en insertos bicamerales, en el medio apical con medio sin suero que contenía 1 μM de FeSO_4 (marcado con ^{59}Fe) junto con 0 o 100 μM de CaCl_2 , y luego midió el hierro en el compartimiento apical y en el basolateral mediante conteo gamma. Encontró que el calcio no afectó la captación de hierro, pero sí observó una reducción significativa en la transferencia basolateral de hierro cuando las células se expusieron a 100 μM de CaCl_2 durante 1,5 horas, pero no después de 4 horas de exposición, en comparación con las células cultivadas en ausencia de calcio. Además, encontró que después de 1,5 horas la expresión de DMT1 total se redujo ligeramente ($p=0,06$) y la expresión de FPN total no se vio afectada, pero la FPN unida a la superficie disminuyó significativamente, lo que sugiere la reubicación de la FPN unida a la membrana en un compartimiento intracelular; sin embargo, después de 4 horas, la expresión de DMT1 total se incrementó significativamente y la expresión de FPN aumentó ligeramente ($p=0,06$), con un aumento de FPN en la membrana. [Lönnerdal \(2010\)](#) indica que sus hallazgos sugieren que el efecto del calcio sobre la absorción de hierro es de corta duración y las células Caco-2 se adaptaron al alto contenido de calcio en unas pocas horas, lo cual podría explicar por qué los estudios largo plazo animales y humanos no muestran ningún efecto adverso de la suplementación con calcio sobre el estado del hierro. En este trabajo no se indica si las células Caco-2 se mantuvieron o no antes del experimento en medio de cultivo reducido en hierro, pues si las células permanecieron en medio con concentraciones regulares de hierro, se podría explicar por qué la captación de hierro no se ve intensificada y por qué se redujo el flujo de salida inicial de hierro, ya que el estado celular de hierro sería normal ([Ma y col., 2006b](#)).

– [Shawki y Mackenzie \(2010\)](#) expresaron la isoforma 1A/IRE(+) de DMT1 humano en ovocitos de *Xenopus laevis* y examinaron su actividad utilizando ensayos de marcador

radiactivo para medir la captación de iones metálicos durante 10 minutos. Encontraron que DMT1 no mediaba la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ($2\ \mu\text{M}$ o $100\ \mu\text{M}$, como CaCl_2), pero que el calcio ($20\ \text{mM}$) si inhibe la captación de $^{55}\text{Fe}^{2+}$ ($2\ \mu\text{M}$ como FeCl_3) en un $52\% \pm 5\%$ y disminuye la velocidad máxima de la reacción (V_{max}) para la captación específica de $^{55}\text{Fe}^{2+}$ por DMT1 en un $48\% \pm 6\%$, sin efecto en la constante de Michaelis-Menten (K_M), lo que indica que el calcio actuaría como un inhibidor no competitivo del transporte hierro mediado por DMT1, pero no es sustrato de este transportador.

– [Thompson y col. \(2010\)](#) midieron la formación de ferritina y examinaron la expresión y localización subcelular de DMT1 y FPN, empleando células Caco-2 luego de 12 días de cultivo en DMEM con 10 % de suero bovino fetal (SBF) y 1 día de incubación previo a los experimentos con medio sin SBF. Informaron que en las células incubadas durante 2 horas con calcio (como CaCl_2) y $30\ \mu\text{M}$ de hierro (como citrato de amonio férrico), el calcio redujo la formación de ferritina a aproximadamente la mitad luego de 16–24 horas de la incubación, de una manera dependiente de la dosis de calcio, con efectos significativos sólo para concentraciones de CaCl_2 mayores a $1,25\ \text{mM}$. Los autores también mostraron una disminución significativa de los niveles DMT1 en la membrana celular de las células Caco-2 tratadas durante 4 horas con $2,5\ \text{mM}$ de CaCl_2 , con $30\ \mu\text{M}$ de citrato de amonio férrico o con ambos metales, sin efecto en la expresión celular total de DMT1; además, no observaron diferencias en la expresión de ferroportina total o en la fracción de ferroportina correspondiente a la membrana celular para los diferentes tratamientos. Sus hallazgos apoyan la hipótesis de que el calcio ejerce un efecto inhibitorio en la membrana apical al disminuir los niveles de DMT1 en la membrana celular. Varios autores ([Gaitán y col., 2011b](#); [Herrera y col., 2015](#); [Beck y Coad, 2017](#)) han señalado que el efecto inhibitorio observado puede resultar del uso de citrato, que se ha propuesto que es un inhibidor de la absorción de hierro en humanos, lo que podrían objetar los resultados obtenidos en este estudio.

– [Gaitán y col. \(2011\)](#) evaluaron durante 1 hora el efecto del CaCl_2 sobre la captación, flujo de salida y absorción neta de hierro no hemo desde una solución de transporte ($50\ \text{mM}$ HEPES, $130\ \text{mM}$ NaCl , $1\ \text{mM}$ MgSO_4 , $10\ \text{mM}$ KCl , y $0,5\ \text{mM}$ CaCl_2) con $2\ \mu\text{M}$ de FeCl_3 (marcado con ^{55}Fe), administrando el calcio en proporciones molares de Ca:Fe de 50:1–1000:1, en células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales en medio IMDM con 10 % de SBF. Se observó que el calcio no afectó la absorción neta de hierro no hemo, pero la captación de hierro sí fue significativamente mayor en relaciones molares de 500:1 y 1000:1 comparada con la captación del grupo de control, mientras que el flujo de salida de hierro disminuyó significativamente para la relación molar de Ca:Fe 1000:1. Debe considerarse que en esta investigación el grupo de control se incubó en una solución donde la relación molar de Ca:Fe era de 50:1; sin embargo, se ha reportado que el calcio ejerce un efecto inhibitorio sobre la absorción de hierro con relaciones molares que van desde Ca:Fe 10:1 ([Hallberg y col., 1991](#); [Kalgaonkar y Lönnerdal, 2008](#)). Además, el medio IMDM contiene transferrina, lo que podría explicar la mayor captación de hierro y la disminución de su flujo de salida, debido a los flujos de hierro desde el medio basal a la célula mediados por la transferrina.

– [Gaitán y col. \(2011b\)](#) desarrollaron un estudio en el que participaron 54 mujeres sanas no embarazadas, y encontraron que cuando $5\ \text{mg}$ de hierro (no hemo como sulfato ferroso y hemo como glóbulos rojos concentrados de conejos) se consumen junto con dosis

de calcio entre 200 y 1500 mg (como cloruro de calcio) con el estómago vacío, el efecto inhibitor del calcio solo se observó cuando este se ingiere en dosis superiores a 800 mg.

– Walczyk y col. (2014) cuantificaron el efecto inhibitor del calcio (0, 100 y 200 mg/comida como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) sobre la absorción de hierro (sulfato ferroso) en niños con estados normales de hierro y con anemia por deficiencia de hierro (IDA), a partir de una bebida a base de caseína/suero, y encontraron que el calcio inhibe de la absorción de hierro en los niños y que su efecto inhibitor se superó fácilmente mediante la adición de ácido ascórbico. Además, reportaron que la absorción de hierro presente en la bebida láctea, sin agregar calcio ni ácido ascórbico, fue 20 % mayor en los niños con IDA.

– Ríos-Castillo y col. (2014) proporcionaron diariamente días 600 mg de CaCO_3 (n=13) o un placebo (n=13) a mujeres sanas durante 34 días, y encontraron, utilizando radioisótopos ^{55}Fe y ^{59}Fe , que la administración de suplementos de calcio no produjo diferencias significativas en la biodisponibilidad de hierro (hemo o no hemo), y sugieren que el cuerpo puede regular la respuesta de absorción de hierro, probablemente a través de una respuesta adaptativa del enterocito.

– Andrews y col. (2014) evaluaron el efecto del calcio sobre el proceso de captación de hierro utilizando las células Caco-2, las cuales cultivaron durante 5 días en DMEM con 10 % de SBF en placas de 6 pocillos. El día del experimento, las incubaron con hierro (10, 20 o 30 μM) y con CaCl_2 (0, 500 o 1000 μM) durante 24 horas, y luego, determinaron la captación de 10 μM de ^{55}Fe por 1 hora en una solución de transporte (50 mM HEPES, 130 nM NaCl, 1 mM MgSO_4 , 10 mM KCl), y encontraron que la captación de ^{55}Fe sólo fue inhibida significativamente cuando las células fueron preincubadas con 20 o 30 μM de hierro y 500 μM de CaCl_2 , en comparación con el grupo de control (células sin CaCl_2) que consistió en células incubadas con DMEM y 10 μM de Fe-NTA (1:2,2 FeCl_3 -Nitrilotriacético). En el desarrollo experimental de este trabajo, los investigadores consideraron como grupo de control a las células Caco-2 sin CaCl_2 incubadas con 10 μM de Fe-NTA en DMEM. Sin embargo, DMEM contiene 1,8 mM de CaCl_2 en su composición, lo cual implica que el grupo de control en realidad sí se incubó con calcio.

– Hennigar y col. (2016) realizaron un estudio en hombres y mujeres que realizan 9 semanas de entrenamiento militar, durante las cuales les suministraron una barra de refrigerio fortificada que contenía 1000 mg de calcio o una barra que no contenía calcio dos veces al día entre comidas. Encontraron que el estado del hierro disminuyó en ambos grupos sin diferencias significativas entre ellos, por lo que la disminución podría deberse únicamente al entrenamiento, el cual se ha reportado que se reduce el estado del hierro corporal (Benkhedda y col., 2010).

– Silva y col. (2017) compararon la absorción intestinal de hierro (como sulfato ferroso) y de calcio entre las fórmulas infantiles a base de soja (con calcio como fosfato tricálcico y carbonato de calcio) y leche de vaca (con calcio como fosfato de calcio y carbonato de calcio) en 20 ratas *Wistar* machos destetadas, y encontraron que en estos animales la absorción intestinal de estos metales es similar para ambas fórmulas. Proponen que las cantidades similares de hierro absorbidas se deben al alto contenido de ácido ascórbico y ácido cítrico de ambas fórmulas.

– Candia y col. (2018) estudiaron el efecto de 800 mg de varias sales de calcio (cloruro de calcio, gluconato de calcio, citrato de calcio, carbonato de calcio, lactato de calcio, sulfato de calcio y fosfato de calcio) en la biodisponibilidad de 5 mg hierro no hemo (como FeSO_4) en mujeres en ayunas en edad fértil, encontrando que sólo el citrato de calcio

disminuyó la biodisponibilidad del hierro. Concluyeron que la inhibición de la absorción de hierro no hemo en individuos en ayunas depende de la sal de calcio en cuestión y no solo de la presencia de calcio. Una limitación del presente estudio es que solo las mujeres en edad fértil se incluyeron en la muestra del estudio, y las diferencias en el estado del hierro entre diferentes edades y género de los participantes podrían conducir a diferentes hallazgos.

Los estudios de una sola comida generalmente muestran un efecto inhibitorio agudo del calcio sobre la absorción de hierro, mientras que la mayoría de los estudios de varias comidas, con una mayor variedad de alimentos y diversas concentraciones de otros inhibidores y potenciadores, indican que el calcio solo tiene un efecto limitado sobre la absorción de hierro (Sokoll y Dawson-Hughes, 1992; Minihane y Fairweather-Tait, 1998). Sin embargo, los estudios de una sola comida son una herramienta útil para identificar factores dietéticos que afectan la biodisponibilidad de hierro en humanos y los factores relacionados con el huésped, como el estado corporal del hierro (Benkhedda y col., 2010). Por otro lado, el ácido ascórbico y tejido muscular (carnes), principales potenciadores de la absorción de hierro, también parecen ser capaces de contrarrestar la naturaleza inhibitoria del calcio (Cook y col., 1991; Abrams y col., 2001; Mendoza y col., 2004; Grindler-Pedersen y col., 2004; Walczyk y col., 2014). Esto podría explicar por qué no se observó un efecto negativo del calcio en el proceso de absorción de hierro cuando están presentes estos potenciadores en las comidas. Debe considerarse además que las ratas sintetizan fitasas (Moslemi y col., 2018) y que los lechones y las ratas sintetizan ácido ascórbico de forma endógena (Mahan y col., 2004; Perfecto y col., 2017).

Las investigaciones reportadas hasta ahora dejan en evidencia que no existe consenso sobre el (los) mecanismo(s) implicado(s) en el efecto inhibitorio de la suplementación con calcio sobre el proceso de absorción de hierro. En gran parte de los reportes publicados donde se encontró un efecto negativo del calcio sobre la biodisponibilidad de hierro, los investigadores postulan que este efecto se produce por una “interacción” entre estos dos minerales en un punto común para la absorción de hierro no hemo y hemo; sin embargo, aún se sigue debatiendo si esta interacción ocurre durante la captación de hierro en la membrana apical o en su exportación al torrente sanguíneo desde la membrana basolateral de los enterocitos duodenales. Para dilucidar el mecanismo por el cual el calcio inhibe la biodisponibilidad de hierro, es necesario unificar condiciones experimentales que permitan comparar las investigaciones desarrolladas en esta área, ya que las discrepancias encontradas entre los estudios posiblemente se deban, por ejemplo, a los diferentes tiempos de incubación, las diferentes sales de hierro y de calcio utilizadas, las diferentes proporciones molares de Ca:Fe, o las diferentes composiciones de las comidas o de los medios de cultivo.

1.6 Modelos Matemáticos

1.6.1 Modelos Biológicos

1.6.1.1 Modelos de estados para representar el transporte mediado por proteínas

En estos modelos, la proteína se considera como la entidad fundamental, y se define una cantidad N de conformaciones (estados) que debe seguir la proteína para transportar el

sustrato, mientras que las transiciones entre dichos estados se consideran reacciones de primer orden y sus constantes de velocidades entre los estados $i \rightarrow j$ se denota $\alpha_{i,j}$.

Existen numerosos ejemplos de macromoléculas que se pueden encontrar en un número finito de estados discretos, y que mientras desarrollan su función en estado estacionario varían entre dichos estados hasta formar un ciclo (Hill, 1977). Las transiciones entre los estados pueden involucrar interacciones con ligandos, sustratos, productos o cambios conformacionales en la macromolécula debido a un cambio en su energía libre.

Para determinar los posibles estados y transiciones que formarán parte del modelo, es necesario realizar pruebas experimentales que permitan recopilar la información necesaria para cada proteína en particular. Sin embargo, para los transportadores de membrana, se han descrito modelos genéricos de estados para los diferentes tipos de transporte, los cuales se presentan en la Figura 1.4.

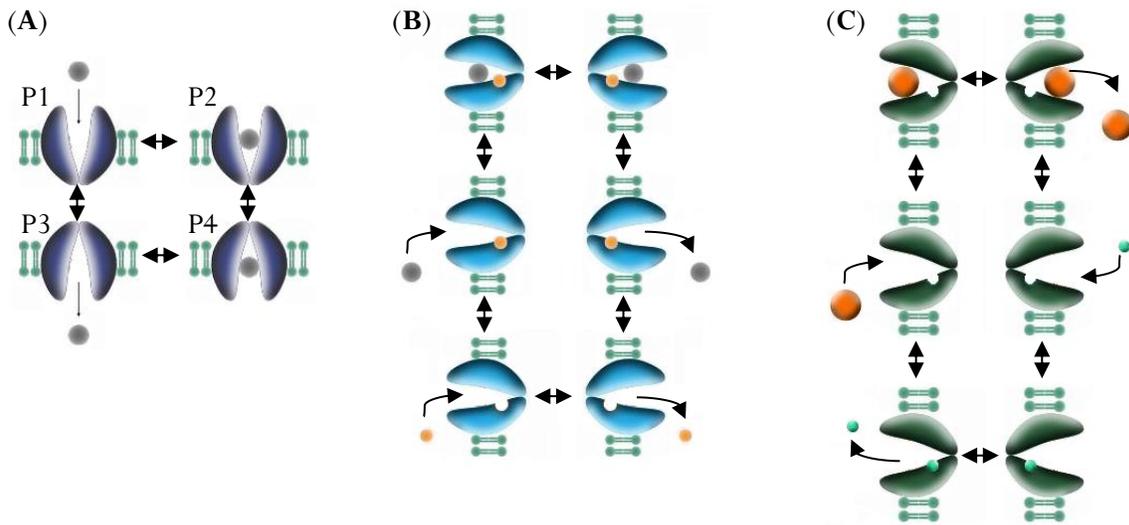


Figura 1.4. Diagramas de estados de proteínas transportadoras de membrana: (A) Uniportadoras; (B) Simportadoras; (C) Antiportadoras. Tomada de (Sproles, 2017).

Para cada conformación de la proteína, se puede describir su balance de masa (ecuación diferencial de primer orden); por ejemplo, para la Figura 1.4 (A), la ecuación para P_1 viene dada por:

$$\frac{dP_1}{dt} = -\alpha_{1,2} \cdot P_1 + \alpha_{2,1} \cdot P_2 - \alpha_{1,3} \cdot P_1 + \alpha_{3,1} \cdot P_3 \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

además, por conservación de masa, se tiene que la cantidad de proteína total está dada por:

$$P_T = P_1 + P_2 + P_3 + P_4 \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

En algunos casos las velocidades de cada una de las transiciones se pueden determinar mediante técnicas experimentales, pero para la mayoría de los casos se realiza un ajuste de parámetros para determinarlas, basándose en ensayos de la actividad de la proteína (Hilgemann y col., 1992).

1.6.1.2 Modelos biológicos oscilatorios

En biología las reacciones oscilatorias son muy comunes y suelen producirse por la realimentación o *feedback* de las reacciones que componen cada proceso biológico (Tsai y col., 2008). Ejemplos simples de modelos de ciclo celular pueden operar como osciladores

autónomos (Ferrell y col., 2011), donde el bucle de retroalimentación (negativa o positiva) de los componentes que interactúan en el sistema biológico tiene el potencial de generar oscilaciones autosostenidas (Tsai y col., 2008; Novák y Tyson, 2008).

En el *feedback* positivo los productos de la reacción interactúan con los reactantes de manera de formar más producto, lo cual produce un aumento en la velocidad de la reacción, amplificándose la causa de la reacción; por lo tanto, el bucle de retroalimentación positiva en modelos oscilatorios aumenta la robustez de las oscilaciones en un mayor número de condiciones independientemente de los valores de los parámetros (Gonze y Hafner, 2010). Por el contrario, en el *feedback* negativo los productos disminuyen la velocidad de la reacción, disminuyendo el efecto de las posibles perturbaciones de los reactantes (Ball, 1996). Cuando un modelo se combina con un oscilador basado en bucles de retroalimentación positiva y negativa entrelazados, el sistema puede ser capaz de amplificar las oscilaciones sostenidas en el tiempo (Hasty y col., 2002).

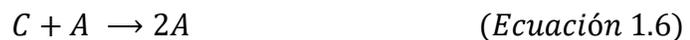
La reacción de Belousov-Zhabotinsky es el sistema de reacción química oscilante más estudiado (Gyorgyi y col., 1990). El modelo propuesto por Ball en 1996 describe este sistema de reacción, siendo capaz de exhibir oscilaciones sostenidas en el tiempo, con un número mínimo de componentes que interactúan a través de reacciones autocatalíticas gobernadas por un *feedback* positivo (Ball, 1996). Para producir oscilaciones sostenidas, es necesario tener un mecanismo competitivo que actúe en contra del ciclo autocatalítico inicial y un mecanismo que retorne los componentes del sistema al punto de inicio, por lo que el modelo considera inicialmente las siguientes reacciones:



donde la síntesis de B se autocataliza hasta que se agota el suministro de A . Estas reacciones no generan oscilaciones por sí mismas, por lo que Ball (1996) agregó en el modelo una nueva reacción autocatalítica que compitiese por la utilización del compuesto B :



donde C solo se puede producir si B está disponible. Las reacciones de las ecuaciones 1.3 y 1.4 producirán el rápido aumento de B si inicialmente se cuenta con A , pero la reacción dada por la ecuación 1.5 producirá el decrecimiento de B y el aumento de C , por lo que se tendrá una oscilación que no se repetirá ya que A se agotará en el paso inicial. Para producir una nueva oscilación es necesario aumentar la cantidad de A y disminuir la cantidad de C , para esto Ball (1996) agregó una nueva reacción:



donde A solo se puede producir si C está disponible. De esta manera se vuelve al punto inicial, cerrando el círculo de reacciones autocatalíticas y las oscilaciones se repiten continuamente. Si inicialmente se tienen los componentes A , B y C (si son diferentes de cero) es posible omitir la reacción de la ecuación 1.3, quedando el modelo de Ball como se muestra en la Figura 1.5.

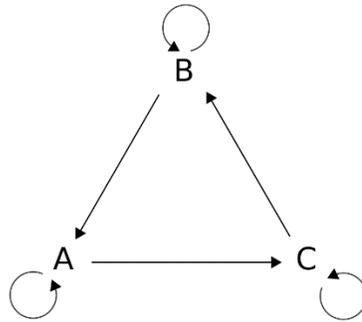


Figura 1.5. Diagrama de estados del modelo oscilatorio de Ball.

1.6.2 Modelos Matemáticos del Sistema de Absorción de Hierro

1.6.2.1 Modelos basados en el metabolismo del hierro a nivel sistémico

- Colli y col. (1982) presentaron un modelo matemático del metabolismo del hierro que comprende los siguientes grupos de hierro dentro del cuerpo: hierro unido a transferrina en el plasma, hierro en los glóbulos rojos circulantes y sus precursores de médula ósea, hierro en las células de la mucosa, parenquimatosas y reticuloendoteliales. El modelo se ilustra en la Figura 1.6, donde $y_i(t), i = 1, 2, \dots, 10$ se refiere a la cantidad de hierro, en mg , en el i -ésimo grupo en el momento t , y $K_j = 1, 2, \dots, 16$, es la velocidad de transferencia fraccional entre dos grupos de hierro. El circuito principal del modelo es el ejercido por la eritropoyetina (hormona liberada por el riñón) y consiste en un flujo unidireccional de hierro que se transfiere del plasma a las células eritroides, donde el hierro se usa para la síntesis de hemoglobina. Una vez que las células eritroides completan su proceso de maduración, ingresan al torrente sanguíneo, reapareciendo así el hierro en los glóbulos rojos circulantes. Las células reticuloendoteliales eliminan la hemoglobina de los glóbulos rojos al final de su vida útil y devuelven el hierro al plasma.

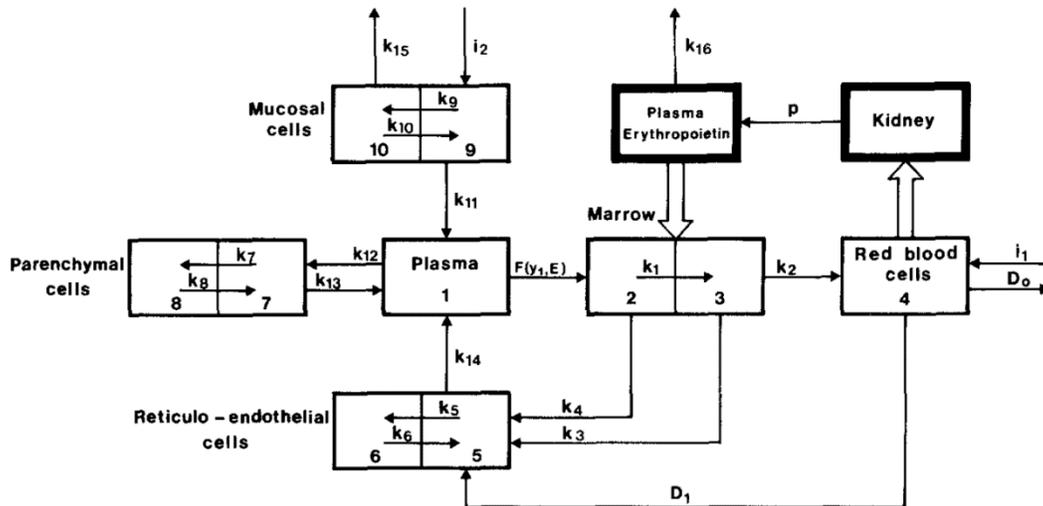


Figura 1.6. Diagrama de bloques del modelo para el metabolismo del hierro. Los bloques de contorno delgado representan depósitos de hierro, mientras que los de contorno grueso representan el mecanismo de control de la eritropoyesis. Las flechas finas representan flujos de hierro o eritropoyetina, mientras que las grandes son las señales de entrada-salida del mecanismo de control.

Tomado de Colli y col. (1982).

El modelo también incluye una descripción de la transferencia de hierro desde la luz intestinal al plasma (absorción intestinal) (i_2), los intercambios de hierro entre el plasma y las células parenquimatosas, y la perturbación ejercida cuando un paciente es sometido a un tratamiento terapéutico como transfusiones de sangre (i_1). Este modelo matemático consiste en un sistema de 11 ecuaciones integro-diferenciales no lineales de tipo retardado, y fue capaz de predecir el contenido de hierro en los diferentes compartimientos del cuerpo, para un paciente con anemia hemolítica sometido a repetidas e iguales transfusiones de sangre seguidas de esplenectomía (extirpación el bazo)

- Nathanson y col. (1984) desarrollaron un modelo matemático de ocho compartimientos que describe los procesos fisiológicos de la absorción intestinal de hierro de la dieta (Figura 1.7). El modelo explica la captación de hierro en el lumen duodenal, seguido la transferencia directa de hierro al plasma o de la incorporación de hierro en un grupo de almacenamiento de la mucosa intestinal donde la mayor parte de este hierro se retiene hasta que las células de la mucosa se exfolian en el lumen duodenal al final de su vida útil. Los compartimientos 1–5 describen la absorción de hierro, y los compartimientos 5–8 describen el intercambio interno del hierro. Este modelo matemático consiste en un sistema de 8 ecuaciones integro-diferenciales (\dot{x}_i), donde $x_i(t)$ es la fracción de la dosis de hierro marcado en el compartimento i ($i = 1, \dots, 8$) en el tiempo t ; r_{ij} es la tasa de transferencia fraccional de hierro al compartimento i desde el compartimento j . Las dos salidas del modelo representan el hierro marcado total en el plasma ($y_1 = x_5$) y el hierro marcado en todo el cuerpo ($y_2 = \sum x_i$). El modelo fue validado mediante experimentos de seguimiento con marcadores radioactivos (^{55}Fe y ^{59}Fe) por 2 semanas en tres perros *beagle* machos adultos normales.

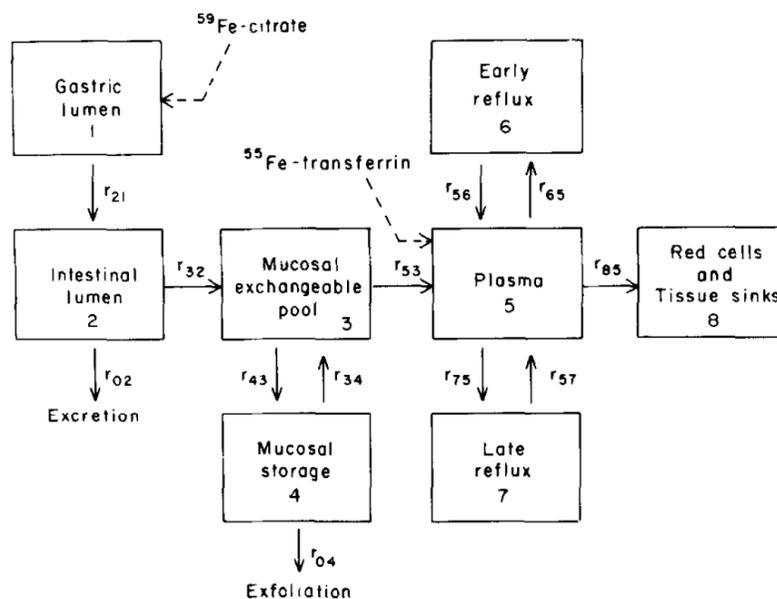


Figura 1.7. Modelo de 8 compartimientos de la absorción de hierro y cinética de hierro en plasma. Tomada de Nathanson y col. (1984).

- Lao y Kamei (2006) desarrollaron un modelo compartimental (Figura 1.8) para investigar el mecanismo de la homeostasis del hierro y los trastornos de sobrecarga de hierro asociados con su desregulación que, además del papel del duodeno, incluye el papel del hígado como sitio clave para la regulación de la absorción de hierro. Cada

compartimento representa la cantidad de hierro asociada con un estado particular (hierro libre en sangre (NTBI) o unido a la transferrina diférrica (FeTf)) o a su ubicación (hierro en los hepatocitos, en los glóbulos rojos (RBC) o en los macrófagos). El modelo consiste en un sistema de 5 ecuaciones integro-diferenciales no lineales.

Las simulaciones de la anemia y la estimulación de la eritropoyesis los llevaron a concluir que Tf-diférrica puede servir como un enlace entre el compartimento eritroide y el mecanismo regulador de hierro. Además, las simulaciones del mecanismo regulador de hierro revelaron que la IRE de FPN es necesaria para estabilizar los niveles de hierro intracelular en respuesta a las demandas cambiantes de hierro y permitir una regulación adecuada del hierro a través de la Tf-diférrica.

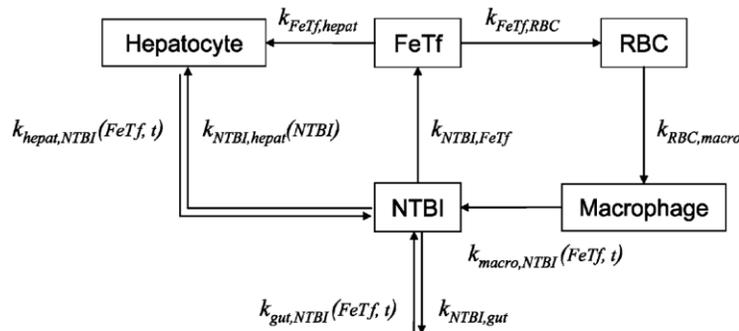


Figura 1.8. Diagrama del modelo compartimental.
Tomada de Lao y Kamei (2006).

- **Enculescu y col. (2017)** construyeron un modelo matemático mecanístico de la regulación sistémica del hierro para todo el cuerpo, que incorpora la dinámica de los flujos de hierro entre los órganos, así como la regulación del metabolismo del hierro por el sistema hepcidina/ferroportina. El modelo (Figura 1.9) consta de 20 ecuaciones diferenciales ordinarias y considera siete compartimientos de hierro: el suero (*Fe serum*), el hígado (*Fe liver*), el bazo (*Fe spleen*), la médula ósea (*Fe bone marrow*), los glóbulos rojos (*Fe red blood cells*), el duodeno (*Fe duodenum*) y otros órganos (*other organs*) que representa el contenido de hierro del resto del cuerpo. La concentración de hierro en el suero es el eje central, desde donde el hierro puede importarse a varios órganos; además, el hierro también se puede exportar desde los compartimentos periféricos al suero, proceso regulado por FPN. El modelo considera la captación y pérdida de hierro en el duodeno, y la pérdida de hierro en el compartimento ‘otros órganos’, que representa la pérdida por la descamación de las células de la piel. Los glóbulos rojos reciben hierro del plasma a través del compartimento de la médula ósea y entregan hierro a los macrófagos del bazo, que reciclan el hierro de los glóbulos rojos senescentes. Además, se incluye la captación de hierro por los macrófagos del bazo debido a la eritropoyesis ineficaz.

Los datos utilizados para el ajuste y validación de este modelo los obtuvieron a partir de mediciones experimentales de los niveles de hierro en suero, hígado, bazo, duodeno y glóbulos rojos de ratones macho C57BL (normales o *knockout* para hepcidina). A los ratones con 4 a 6 semanas les administraron una dieta normal, que contenía 200 ppm de hierro, o una dieta alta en hierro que contenía aproximadamente 20000 ppm de hierro. Después de 4 semanas, expusieron a los ratones a un estímulo inflamatorio, que consistía en una inyección peritoneal de 1 μ g de LPS/g de peso corporal, y los sacrificaron 6/18/48 horas después de la inyección. El modelo de **Enculescu y col. (2017)** reprodujo cuantitativamente las principales características del metabolismo sistémico del hierro y

predijo con precisión la dinámica de la homeostasis del hierro de los ratones bajo distintas condiciones experimentales (estímulos de LPS en condiciones de sobrecarga o normales de hierro).

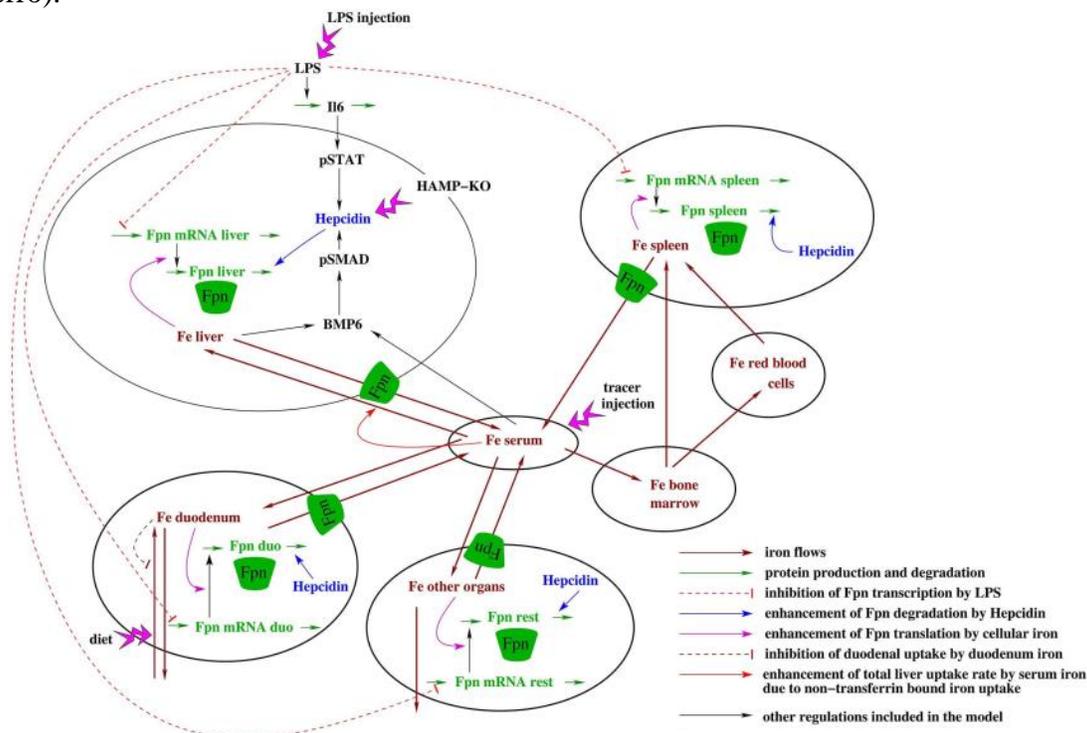


Figura 1.9. Esquema del modelo que incluye los grupos de hierro, los flujos de hierro y la regulación de los niveles sistémicos de hierro por el sistema regulador de hepcidina/ferroportina.

Tomado de Enculescu y col. (2017).

1.6.2.2 Modelos basados en el metabolismo del hierro a nivel celular

- Mackenzie y col. (2005)** propusieron un mecanismo cinético representado por un ciclo formado por ocho estados conformacionales como se muestra en la **Figura 1.10**, para describir el transporte de Fe^{2+} y/o H^+ mediado por DMT1, donde el ciclo 1-2a-5a-6 representa la vía de transporte de hierro desacoplada del flujo de protones, y el ciclo 1-6 la vía con los flujos de H^+ y Fe^{2+} acoplados. Sin embargo, sólo plantearon el mecanismo, pues no determinaron las constantes ni simularon el modelo propuesto.

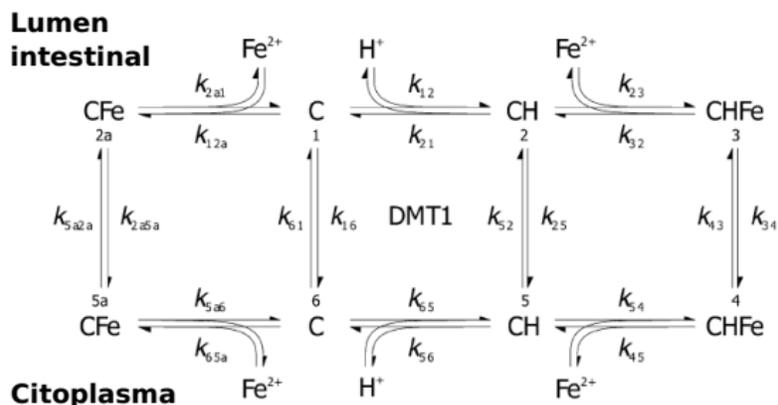


Figura 1.10. Modelo cinético de DMT1.

Tomada de Mackenzie y col. (2005).

- [Salgado y col. \(2010\)](#) desarrollaron un modelo matemático para estudiar la dinámica del almacenamiento y distribución de hierro en la ferritina y mostrar su relevancia para controlar el hierro lábil citosólico (cLIP) durante la absorción intestinal de hierro. En este trabajo se establecieron un conjunto de ecuaciones diferenciales considerando expresiones cinéticas para las principales reacciones, y balances de masa para la ferritina, el hierro y una población discreta de especies de ferritina definidas por su contenido respectivo de hierro. El mecanismo que plantearon para la captación/liberación de hierro por ferritina se muestra en la [Figura 1.11](#). La ferritina secuestra Fe^{2+} del medio externo; Fe^{2+} se oxida a Fe^{3+} en los sitios catalíticos, seguido por la nucleación mineral dentro de la cavidad interna de la ferritina, almacenando así el hierro como especies insolubles de Fe^{3+} .

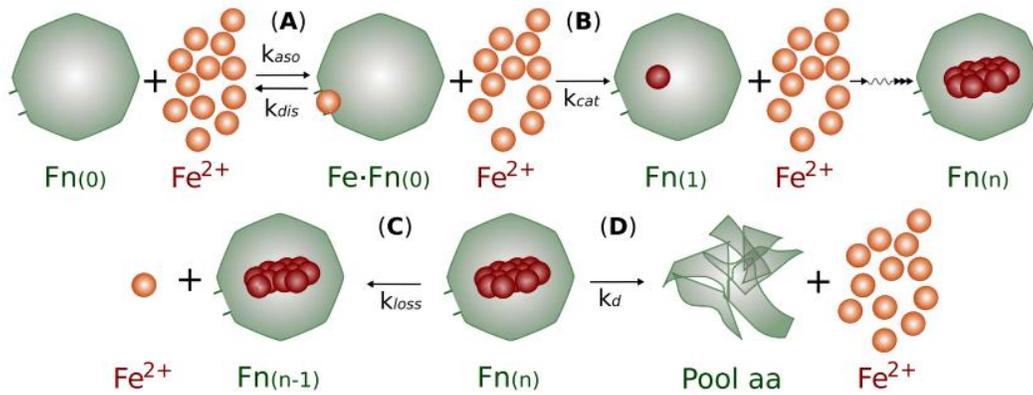


Figura 1.11. Mecanismo propuesto para la captación/liberación de hierro por ferritina. (A) El hierro (Fe) ingresa a través de un poro en la estructura de jaula de la proteína apoferritina ($\text{Fn}_{(0)}$), formando un complejo de hierro-ferritina (FeFn_0) a través de un proceso reversible. (B) Una serie de reacciones redox conducen la incorporación de hierro en el núcleo mineral de la ferritina ($\text{Fn}_{(1)}$). Después de n pasos de incorporación, se obtiene la especie de ferritina $\text{Fn}_{(n)}$. (C) El hierro se puede liberar desde el núcleo mineral a través de procesos redox y de transporte. (D) Las moléculas de ferritina también pueden degradarse proteolíticamente, devolviendo todo su contenido de hierro al cLIP durante este proceso.

Tomada de [Salgado y col. \(2010\)](#).

En este modelo, describieron la reacción enzimática global mediante un mecanismo tipo Michaelis-Menten con procesos de asociación, disociación y catalíticos caracterizados por una constante cinética, k_{aso} , k_{dis} y k_{cat} respectivamente. k_{aso}/k_{dis} representa la constante de equilibrio de afinidad de los poros de una jaula de ferritina para Fe^{2+} externo, y k_{cat} abarca las tasas de oxidación, translocación y precipitación en los poros. La ferritina, es modificada por la reacción al aumentar su contenido de hierro; de esta manera, crearon una población de diferentes enzimas (jaulas de proteínas de ferritina) con diferentes contenidos de hierro, pero cada nanojaula conserva su actividad catalítica intacta (k_{aso} , k_{dis} y k_{cat}), porque los poros permanecen desbloqueados a menos que la jaula de proteínas se llene de átomos de hierro ($k_{cat} = 0$).

Los datos experimentales utilizados son los de la distribución de las jaulas de ferritina en el gradiente de sacarosa después de cargarse con diferentes contenidos de hierro respecto a la ferritina (de 300:1 a 1800:1 hierro/ferritina). El modelo capturó el patrón de distribución del contenido de hierro en estado estacionario en la ferritina. Los resultados de las simulaciones obtenidas con este modelo mostraron la alta capacidad y efectividad de la ferritina para reaccionar rápidamente y controlar los cambios en la cantidad de cLIP, indicando que la ferritina desempeña el papel de un tampón de hierro en las células, lo cual que está de acuerdo con las observaciones experimentales. El modelo puede capturar las

características principales de las distribuciones experimentales, validando la viabilidad de la estructura mecanística propuesta y los parámetros utilizados en este estudio.

- [Colins y col. \(2017\)](#) desarrollaron un modelo matemático mediante un proceso de regresión simbólica no lineal (SNLR) basado en un algoritmo de programación genética con dos etapas adicionales: una optimización de los parámetros y el cálculo del error de generalización utilizando el método *Jackknife*, con el objetivo de capturar el efecto a corto plazo de la exposición al hierro en la captación apical y sobre los flujos de absorción de hierro en las células Caco-2. El modelo tiene dos variables de entrada (concentración inicial de hierro en el medio apical y tiempo) y una variable de salida (captación apical de hierro).

Este trabajo es el primer reporte de estudios a corto plazo del proceso de captación de hierro apical *in vitro*, en el cual midieron la cantidad de hierro que ingresó a las células Caco-2 cuando las concentraciones iniciales de hierro ($^{55}\text{FeCl}_3$ -ascorbato a 1:20 mol:mol) en los medios apicales fueron de 5, 10 y 20 μM , durante 15 minutos después de la exposición al metal. Los datos experimentales mostraron un comportamiento no lineal en la dinámica de captación apical de hierro, la cual, según los autores, podría estar asociada a la interacción entre el hierro y el transportador DMT1 y a fenómenos como la internalización de los transportadores DMT1 presentes en la membrana apical y el bloqueo de la mucosa. En este trabajo se demostró además que, tal como se esperaba, esta compleja dinámica de captación apical de hierro no puede ser representada por los mecanismos de Michaelis-Menten y Hill, ya que estos modelos suponen que cantidad de transportadores DMT1 presentes en la membrana durante el proceso de absorción es constante, es decir, no consideran el bloqueo mucosal.

El mejor modelo generado por el algoritmo GP, luego de eliminar términos sinusoidales, está representado por la ecuación (1.7), donde Ap_{Up} representa la captación de hierro apical (en $pmol/insert$), C_0 corresponde a la concentración inicial de hierro apical en μM , t es el tiempo en minutos y β_i son los parámetros ajustados del modelo. Los resultados de la simulación para la absorción de hierro para este modelo se muestran en la [Figura 1.12](#). El modelo obtenido por [Colins y col. \(2017\)](#) utilizando el algoritmo de PG, captura las principales características de los fenómenos biológicos observados experimentalmente en los flujos de absorción de hierro apical. Este modelo es una función del tiempo y la concentración inicial de hierro apical, con un componente lineal que captura la tendencia global del sistema y un componente no lineal (cuadrático- exponencial) asociado al cambio en la velocidad de absorción de hierro como resultado de la internalización de DMT1.

$$Ap_{Up}(C_0, t) = \beta_1 \cdot C_0 - \sin(\beta_6) \cdot t \cdot C_0 \cdot (C_0 + \beta_3 - \beta_5 \cdot t \cdot \beta_4^t) \text{ (Ecuación 1.7)}$$

- [Cegarra y col. \(2019\)](#) desarrollaron un modelo fenomenológico basado en una descripción de los estados DMT1 en los enterocitos y su internalización, que considera los principales componentes biológicos del proceso de captación de hierro para representar la compleja dinámica de éste observada experimentalmente en células Caco-2. El modelo llamado “*DMT1 swinging-mechanism model*” ([Figura 1.13](#)) consiste en una representación cíclica de cuatro estados del mecanismo cinético DMT1 en la membrana apical ($P_1 - P_4$), acoplado con el oscilador de Ball a través del estado P_4 para representar el comportamiento oscilatorio de la relocalización de DMT1 a dominios intracelulares como la interacción de un conjunto de reacciones autocatalíticas luego de exponer a las células a un desafío de hierro ([Nuñez, 2010](#); [Esparza y col., 2015](#)). La descripción de los estados de DMT1 está basada en el mecanismo presentado por [Mackenzie y col. \(2006\)](#).

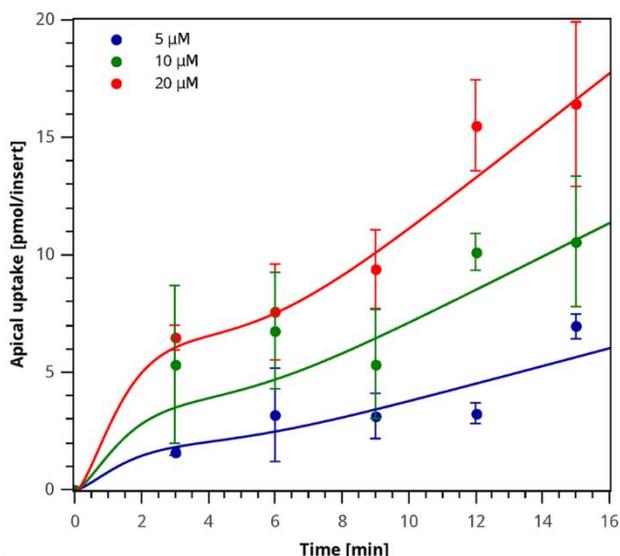


Figura 1.12. Datos experimentales y simulación del modelo de Colins y col. (2017). Simulación del modelo (curvas) y datos experimentales (círculos) de la captación apical de hierro después de un desafío de $5 \mu\text{M}$ (círculos azules), $10 \mu\text{M}$ (círculos verdes) o $20 \mu\text{M}$ (círculos rojos) de hierro en el medio apical de las células Caco-2. Los círculos corresponden al valor promedio de la muestra y las barras de error indican su desviación estándar.

Tomado de Colins y col. (2017).

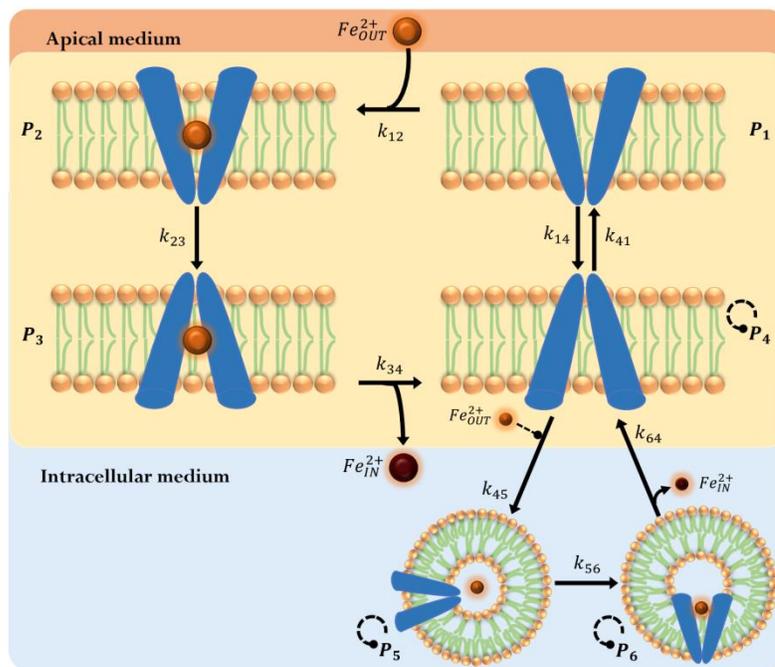


Figura 1.13 *DMT1 swinging-mechanism model*. DMT1 vacío (P_1) está orientado hacia el lado apical donde puede unirse a Fe^{2+} (P_2), entonces sufre un cambio conformacional (P_3), libera hierro al medio intracelular (P_4) y vuelve a su estado original (P_1). DMT1 en el estado P_4 puede ser endocitada en vesículas que contienen hierro (P_5), donde puede cambiar a un estado capaz de liberar hierro de la vesícula al cLIP (P_6). (círculo naranja): concentración de hierro apical ($\text{Fe}_{\text{OUT}}^{2+}$). (círculo marrón): concentración de hierro en el espacio intracelular-basolateral ($\text{Fe}_{\text{IN}}^{2+}$). Las reacciones autocatalíticas de los estados P_4 , P_5 y P_6 están representadas por una flecha moduladora discontinua. El hierro extracelular se considera un factor regulador en la endocitosis, representado como una flecha moduladora discontinua.

Tomada de Cegarra y col. (2019).

En el modelo, P_i corresponde a la fracción de DMT1 en el estado i , y k_{ij} , la constante cinética asociada a la transición entre los estados i y j . Los parámetros del modelo propuestos fueron ajustados utilizando los datos experimentales para la captación de hierro durante un primer desafío como un conjunto de entrenamiento, y minimizando el error de generalización dado por el error cuadrático medio de Jackknife (MSE_{jk}). Los datos de captación de hierro para el segundo desafío los utilizaron para validar el modelo.

Los datos experimentales en la [Figura 1.14a](#) muestran que la cantidad de hierro apical absorbido es mayor durante la primera exposición al hierro, lo que podrían atribuirse a la reducción en la cantidad de DMT1 presente en la membrana apical después de la exposición al hierro, como resultado del bloqueo de la mucosa sugerido por [Nuñez, 2010](#). Los resultados de la simulación indican que el modelo es capaz de representar, tanto cualitativa como cuantitativamente, la dinámica de la captación de hierro de acuerdo con los datos experimentales ([Figura 1.14a](#)), capturando la disminución en la tasa de absorción de hierro observada cuando las células se exponen a un segundo desafío de hierro en el medio apical. Como se observa en la [Figura 1.14b](#), el modelo mantiene a DMT1 endocitado ($P_5 + P_6$) durante más tiempo que en la membrana apical, lo cual fortalece la idea de que la absorción de hierro es un proceso altamente controlado. Por lo tanto, el modelo muestra una buena correlación con los datos experimentales y es capaz de capturar el fenómeno regulador del bloqueo de la mucosa.

La simulación de los flujos de absorción de hierro y el comportamiento de DMT1 a lo largo del tiempo dada por el *DMT1 swinging-mechanism model*, luego de dos desafíos de hierro en el medio apical de las células se muestran en la [Figura 1.14](#).

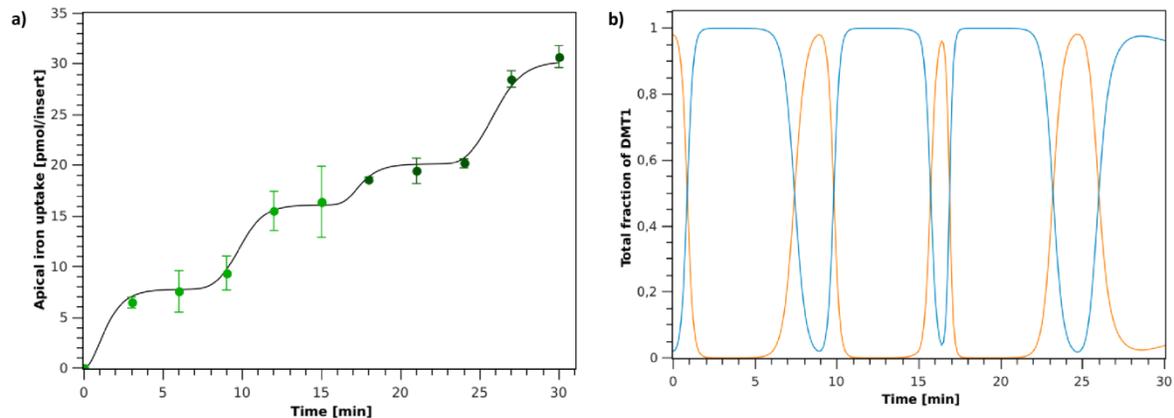


Figura 1.14. Simulación del *DMT1 swinging-mechanism model*. **a:** Captación de hierro apical después del primer (0-15 min) y segundo (15-30 min) desafío de hierro. (○): el valor promedio de la muestra y las barras de error indican su desviación estándar; (—): simulación de modelo. **b:** Simulación del comportamiento del ciclo endocítico DMT1 durante la absorción de hierro para el primer (0-15 min) y segundo (15-30 min) desafío de hierro. (línea naranja): fracción de DMT1 en la membrana apical ($P_1 + P_2 + P_3 + P_4$); (línea azul): fracción de DMT1 en estado endocitado ($P_5 + P_6$).

Tomada de [Cegarra y col. \(2019\)](#).

1.7 Línea Celular Caco-2

La línea de células epiteliales cancerígenas Caco-2, provenientes del adenocarcinoma de colon humano, se ha utilizado ampliamente como modelo *in vitro* del epitelio intestinal para predecir la absorción intestinal de diferentes compuestos y de

potenciales candidatos a fármacos (Beck y Coad, 2017; Sambuy y col., 2005). Desde 1980, la línea celular Caco-2 es uno de los modelos de absorción *in vitro* más aceptados para simular el transporte intestinal de hierro y estudiar los mecanismos asociados con la regulación del proceso de absorción de este metal, ya que es fácil de usar, produce resultados que se correlacionan fuertemente con estudios en animales y humanos, y se consideran un modelo útil para predecir la biodisponibilidad de hierro en humanos (Herrera y col., 2015; Au y Reddy, 2000; Beck y Coad, 2017; Yun y col., 2004). Por ejemplo, se ha probado que en las células Caco-2 el aumento de las concentraciones de hierro provoca un mayor daño al ADN, como ocurre con las células del cuerpo por la toxicidad que genera la acumulación de metales (Srigiridhar y col., 2001; Núñez y col., 2001).

Las células Caco-2 pueden diferenciarse espontáneamente en monocapas polarizadas de enterocitos intestinales maduros que poseen propiedades morfológicas y funcionales similares a las del intestino delgado humano (Alvarez-Hernandez y col., 1991; Natoli y col., 2012). Las superficies apicales y basolaterales están separadas por uniones estrechas, y la membrana apical presenta microvellosidades (Mostov y col., 2003). Estas células pueden transportar activamente sales biliares, vitaminas, aminoácidos y medicamentos, sintetizar metalotioneína y transportar y metabolizar ácidos grasos (García-Casal y col., 2000), y reportan una alta correlación con la absorción observada en animales y humanos (Yun y col., 2004; Herrera y col., 2015; Beck y Coad, 2017). Lo anterior ha permitido en los últimos años el desarrollo de nuevos métodos para comprender e investigar los mecanismos celulares implicados en la absorción de nutrientes y de fármacos (Hidalgo y col., 1989; Arredondo y col., 2008; Bricks y col., 2014).

Estas células expresan los componentes que actualmente se sabe que se requieren para el transporte de hierro no hemo, incluidos DMT1 y FPN (Ma y col., 2002), quienes median los flujos de hierro bidireccionales entre las membranas apical y basolateral de las células Caco-2 (Núñez y col., 2010). Además, al igual que en el intestino humano y de ratas, la expresión de DMT1 en la BBM aumenta en respuesta a la privación de hierro (Ma y col., 2006b; Scheers, 2013). Por otro lado, se ha reportado que en las células Caco-2, la captación de hierro apical, la síntesis de ferritina y el transporte transepitelial de hierro están fuertemente regulados dentro de un margen estrecho por las concentraciones intracelulares de hierro (Tapia y col., 1996).

Con el uso de microscopía confocal, se ha demostrado que DMT1 en células Caco-2 alimentadas con hierro desde la membrana apical, sufre endocitosis y puede detectarse en el citoplasma apical sobre el núcleo, internalizándose más del 30 % de DMT1 luego de los primeros 10 minutos de exposición al hierro y continuando la internalización durante aproximadamente 40 minutos, después de lo cual parece que se alcanza el equilibrio con algún retorno de DMT1 al ribete en cepillo de la membrana apical (Ma y col., 2006b; Esparza y col., 2015).

Se reportado un aumento en los niveles de ferritina en las células Caco-2 en presencia de hierro hemo y no hemo, lo que sugiere el aumento de las reservas de hierro dentro de las células (Cermak y col., 1993). Al igual que las células de enterocitos humanos normales, las células Caco-2 contienen la enzima HO1, cuya actividad puede inducirse tanto por la presencia de hemo como por metales pesados como el cadmio (Cable y col., 1993).

La expresión endógena de DcytB en células Caco-2 es muy baja y por ello en ausencia de ascorbato absorben un nivel basal de hierro muy bajo. Sin embargo, se ha

demostrado que la sobreexpresión de DcytB en estas células estimula la captación de hierro (Thumser y col., 2010).

Wawer y col. (2014) reportaron que en las células Caco-2, sembradas en placas de 6 pocillos, el promedio de proteína celular es de $0,18 \pm 0,032 \text{ mg/cm}^2$ de área de cultivo, y que la concentración promedio de ferritina en células no expuestas a ningún tratamiento con hierro es de $3,8 \pm 0,7 \text{ ng/mg}$ de proteína total. La Tabla 1.1 resume las principales características del cultivo celular de Caco-2.

Si bien los estudios en modelos animales y humanos permiten evaluar de manera más precisa los mecanismos de absorción de diferentes compuestos y fármacos, estos estudios demandan una gran cantidad de compuestos para desarrollar los experimentos, necesitan de una amplia infraestructura y requieren el seguimiento de lineamientos éticos debido a que el objeto de estudio son organismos vivos (Joyce y col., 1987). Además, en el caso de la absorción de hierro, estos modelos no permitirían correlacionar inequívocamente la concentración de otro metal divalente en el medio extracelular con la absorción de hierro, debido a la diversidad de especies y las diferencias intrínsecas entre los sujetos (Tapia y col., 1996). Por ello, es fundamental el uso de una línea celular que represente poblaciones celulares homogéneas y cuyas condiciones de cultivo puedan regularse estrictamente.

Considerando lo expuesto anteriormente, en este trabajo se usarán las células Caco-2 para el estudio de los mecanismos de la absorción de hierro y la evaluación del efecto a corto plazo del calcio sobre este proceso.

Tabla 1.1. Características del cultivo de células Caco-2.

Parámetro	Valor	Unidad
Altura celular (Hidalgo y col., 1989)	29,6	μm
Diámetro celular (Hidalgo y col., 1989)	6,2	μm
Volumen del medio apical (Colins y col., 2017)	200	μL
Volumen del medio celular y basolateral (Colins y col., 2017)	1000	μL
Volumen de la monocapa (Colins y col., 2017)	1,67	μL
Área total del enterocito, calculada asumiendo forma cilíndrica (Cegarra y col., 2019)	636,93	μm^2

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de la ausencia y/o presencia de calcio en el movimiento de los transportadores DMT1-1A/IRE(+) y FPN1A durante la captación de hierro no hemo en las células Caco-2, utilizando una combinación de métodos experimentales y modelamiento matemático que permitan describir y caracterizar este movimiento. Adicionalmente se analizará el efecto que tiene un desafío de hierro en el estado de hierro intracelular para las células Caco-2, cuando se realiza en presencia o ausencia de calcio extracelular, y se validará el modelo generado a partir de información experimental.

1.8.2 Objetivos específicos

- 1) Analizar el efecto que tiene un desafío de hierro no hemo en el estado de hierro intracelular (cLIP) para las células Caco-2, cuando dicho desafío se realiza en presencia o ausencia de calcio extracelular.
- 2) Caracterizar experimentalmente el movimiento de los transportadores DMT1-1A/IRE(+) y FPN1A en las células Caco-2 a corto plazo, inducido por la presencia o en ausencia de:
 - i. Hierro no hemo extracelular,
 - ii. Calcio extracelular.
- 3) Plantear un modelo matemático que permita describir el movimiento de DMT1-1A/IRE(+) y FPN1A en las células Caco-2 asociado al proceso de captación de hierro no hemo, en presencia y ausencia de calcio extracelular.
- 4) Validar el modelo generado a partir de un conjunto de datos experimentales diferente al utilizado en la construcción del modelo matemático.

1.9 Resumen de los principales resultados

La memoria de esta tesis se ha organizado según el siguiente esquema:

Capítulo 2: Efecto del calcio extracelular en el estado del hierro lábil citosólico de las células Caco-2, cuando estas se someten a un desafío de hierro no hemo

Los resultados del capítulo 2 responden al objetivo específico 1. En este capítulo, se investiga el efecto del calcio intracelular y extracelular en la captación de hierro no hemo de las células Caco-2, según lo determinado por la extinción de la fluorescencia de la calceína. Se encontró que el calcio extracelular inhibe la captación de hierro por las células Caco-2 de una manera dependiente de la concentración. La quelación del calcio intracelular con BAPTA no afectó la captación de hierro, lo que indica que el efecto inhibitorio del calcio no se ejerce a través de la señalización del calcio intracelular. Los estudios cinéticos realizados proporcionaron evidencia de que el calcio actúa como un inhibidor reversible no competitivo de la actividad de transporte de hierro mediada por DMT1. Con base en estos resultados experimentales, se desarrolló un modelo matemático que considera la dinámica de la inhibición no competitiva utilizando un mecanismo de cuatro estados para describir el efecto inhibitorio del calcio sobre el proceso de transporte de hierro mediado por DMT1 en las células intestinales. El modelo predice con precisión la dinámica de extinción de la fluorescencia de calceína observada experimentalmente después de un desafío con hierro. Por lo tanto, la estructura del modelo propuesto es capaz de representar el efecto inhibitorio del calcio extracelular sobre la entrada de hierro mediada por DMT1 en el grupo de hierro lábil citosólico de las células Caco-2. Teniendo en cuenta el rango de concentraciones de calcio que pueden inhibir la absorción de hierro, se discute la posible inhibición del calcio en la dieta sobre la absorción intestinal de hierro.

Capítulo 3: Caracterización experimental de la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN en las células Caco-2, inducida por la presencia o ausencia en el medio extracelular de hierro no hemo y/o calcio

Los resultados del capítulo 3 responden al objetivo específico 2. En este capítulo se utilizan células Caco-2 polarizadas para estudiar a través de microscopía confocal el movimiento de DMT1-EGFP y FPN- TagRFP entre compartimentos celulares en función

del suministro de hierro en presencia de diferentes concentraciones de calcio, luego de que las células se sometieran a un ayuno de hierro. Mientras mayor fue la concentración de calcio extracelular a la cual se expusieron las células, mayor fue la reubicación de DMT1 en los dominios basales; en cambio, al reducir al mínimo esta concentración de calcio, la concentración apical de DMT1 aumentó significativamente. Además, se encontró que los cambios en la localización de FPN inducidos por las concentraciones de calcio extracelular no fueron significativos. Cuando las células se expusieron a hierro, se indujo una relocalización de DMT1 a los compartimientos intracelulares, pero esta relocalización fue más rápida cuando la concentración de Ca^{2+} extracelular era de $10 \mu\text{M}$ en comparación con 3 mM . Los resultados realizados indican por primera vez que el ciclo endocítico del transportador DMT1 en las células Caco-2 polarizadas está determinado no sólo por la presencia de hierro en el compartimiento apical, sino también por la concentración de calcio en ese compartimiento. Las diferentes dinámicas de relocalización de DMT1 observadas en función de las concentraciones de Ca^{2+} y de Fe^{2+} en el compartimiento apical de las células Caco-2 polarizadas cultivadas en insertos, dejan en evidencia que efectivamente el efecto inhibitorio del calcio sobre la captación de hierro se ejerce sobre DMT1, alterando no solo la ubicación de este transportador en la célula según la concentración de calcio extracelular, sino también su capacidad de transporte de hierro desde el medio extracelular hacia los compartimientos intracelulares.

Capítulo 4: Planteamiento de un modelado matemático para describir el movimiento de DMT1 en la membrana apical de las células Caco-2 debido al efecto inhibitorio del calcio sobre el proceso de captación de hierro no hemo

Los resultados del capítulo 4 responden a los objetivos específicos 3 y 4. En este capítulo se proponen tres modelos fenomenológicos para describir el movimiento de DMT1-1A/IRE(+) en las células Caco-2 asociado a los cambios en la concentración de calcio extracelular en el medio apical y al proceso de captación de hierro no hemo. El *modelo A* sólo consideró un estado para representar la fracción de DMT1 endocitada y unida a Ca^{2+} , pero no logró representar los datos experimentales de la dinámica de DMT1 en la membrana apical cuando únicamente varía la concentración de Ca^{2+} extracelular. El *modelo B* acopla dos osciladores de Ball para representar el comportamiento oscilatorio de la internalización de DMT1, cuando está o no unida a Ca^{2+} , y aunque fue capaz de estimar la fracción de DMT1 en la membrana apical, varios de los parámetros obtenidos del ajuste son negativos. El *modelo C* además de acoplar los dos osciladores de Ball como el *modelo B*, incorporó un nuevo estado de DMT1 en la membrana apical que representa la fracción de este transportador unida tanto a hierro como a calcio. Los parámetros del *modelo C* para todos los casos son positivos y se identificaron como significativos. El *modelo C* planteado reprodujo cualitativa y cuantitativamente las principales características de la variación de la concentración de DMT1 en la membrana apical observada experimentalmente luego de modificar la concentración de calcio en el compartimiento apical de los insertos de las células Caco-2, con o sin la presencia de $10 \mu\text{M}$ de FAS. Para mejorar la predicción del modelo C en el caso donde las concentraciones de hierro y calcio en el medio apical de los insertos eran de $0 \mu\text{M}$ de FAS y 3 mM de CaCl_2 , se forzó para que durante los primeros 3 minutos, sólo llevara a cabo la endocitosis de DMT1, y para que entre los minutos 3 y 11 sólo permitiera el retorno de DMT1 a la membrana, con lo cual se logró mejorar el coeficiente de determinación de $R^2 = 0,7455$ a $R^2 = 0,9523$ para el conjunto de entrenamiento del caso señalado.

Capítulo 5: Conclusiones Generales

En el capítulo 5 se presentan las conclusiones generales de la presente Tesis Doctoral, poniendo en perspectiva el impacto disciplinar de los resultados obtenidos.

Capítulo 2. Efecto del calcio extracelular en el estado del hierro lábil citosólico de las células Caco-2, cuando estas se someten a un desafío de hierro no hemo

Título del artículo: *Calcium is a non-competitive inhibitor of DMT1 on the intestinal iron absorption process: empirical evidence and mathematical modeling analysis.*

Autores: Layimar Cegarra^{1,2,3*}, Pabla Aguirre⁶, Marco T. Nuñez⁶, Ziomara P. Gerdtzen^{2,3,4,5}, J. Cristian Salgado^{1,3}

¹ Laboratory of Process Modeling and Distributed Computing, Department of Chemical Engineering, Biotechnology and Materials, University of Chile, Santiago, Chile, ² Mammalian Cell Culture Laboratory, Department of Chemical Engineering, Biotechnology and Materials, University of Chile, Santiago, Chile, ³ Centre for Biotechnology and Bioengineering, University of Chile, Santiago, Chile, ⁴ Center of Interventional Medicine for Precision and Advanced Cellular Therapy, Santiago, Chile, ⁵ Millennium Nucleus Marine Agronomy of Seaweed Holobionts, ⁶ Iron and Biology of Aging Laboratory, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Chile, Santiago, Chile

Aceptado en: *American Journal of Physiology-Cell Physiology*

Resumen

El hierro y el calcio son metales esenciales para el desarrollo humano y su sobrecarga o deficiencia está relacionada con diversas enfermedades. La absorción de hierro es un proceso complejo y altamente controlado en el que DMT1 transporta hierro no hemo a través del ribete en cepillo de la membrana apical de los enterocitos hasta el citoplasma, pero no transporta metales alcalinotérreos como el calcio. Se ha propuesto que altas concentraciones de calcio en la dieta podrían reducir la biodisponibilidad del hierro; sin embargo, se desconocen las dosis de calcio que afectarían dicha biodisponibilidad y los mecanismos por los que el calcio podría ejercer un efecto inhibitorio sobre la absorción de hierro. En este capítulo, se investiga el efecto del calcio intracelular y extracelular en la captación de hierro no hemo de las células Caco-2, según lo determinado por la extinción de la fluorescencia de la calceína. Se encontró que el calcio extracelular inhibe la captación de hierro por las células Caco-2 de una manera dependiente de la concentración. La quelación del calcio intracelular con BAPTA no afectó la captación de hierro, lo que indica que el efecto inhibitorio del calcio no se ejerce a través de la señalización del calcio intracelular. Los estudios cinéticos realizados proporcionaron evidencia de que el calcio actúa como un inhibidor reversible no competitivo de la actividad de transporte de hierro mediada por DMT1. Con base en estos resultados experimentales, se desarrolló un modelo matemático que considera la dinámica de la inhibición no competitiva utilizando un mecanismo de cuatro estados para describir el efecto inhibitorio del calcio sobre el proceso de transporte de hierro mediado por DMT1 en las células intestinales. El modelo predice con precisión la dinámica de extinción de la fluorescencia de calceína observada experimentalmente después de un desafío con hierro. Por lo tanto, la estructura del modelo propuesto es capaz de representar el efecto inhibitorio del calcio extracelular sobre la entrada de hierro mediada por DMT1 en el grupo de hierro lábil citosólico de las células Caco-2. Teniendo en cuenta el rango de concentraciones de calcio que pueden inhibir la absorción de hierro, se discute la posible inhibición del calcio en la dieta sobre la absorción intestinal de hierro.

2.1 Introducción

El hierro (Fe) y el calcio (Ca) son micronutrientes esenciales para el crecimiento y el normal desarrollo de las funciones biológicas de los seres humanos (Hofer y col., 2008; Cassat y Skaar, 2013; Jaramillo y col., 2015). Una ingesta adecuada de calcio en la dieta es importante para garantizar la mineralización ósea, la prevención del raquitismo en los niños y de la pérdida ósea relacionada con la edad, la contracción muscular, el impulso nervioso, la regulación de los latidos del corazón y el equilibrio de líquidos dentro de las células (Weaver y Heaney, 2006; Jaramillo y col., 2015; Piste y col., 2013). Por otro lado, el suministro adecuado de hierro en la dieta es fundamental para las funciones celulares y enzimáticas normales, ya que se requiere para el transporte de oxígeno a los tejidos (por medio de la hemoglobina en los eritrocitos y la mioglobina en los miocitos), el metabolismo oxidativo, la síntesis de ADN, la función inmune, la respiración celular (Thumser y col., 2010; Scheers, 2013; Lane y col., 2013; Chifman y col., 2014), y actúa como un cofactor crucial para funciones cerebrales importantes, incluida la plasticidad sináptica, la síntesis de mielina y el metabolismo de los neurotransmisores (Nnah y Wessling-Resnick, 2018; Liu y col., 2019). Durante la producción de ATP, el hierro desempeña un papel indispensable ya que actúa como cofactor para los citocromos y los complejos de hierro-azufre de la cadena oxidativa (Lill y col., 2012). Sin embargo, se ha estimado que una gran parte de la población no consume la cantidad recomendada de calcio (1000 mg/día) ni de hierro (18 mg/día) (Harris, 2002; Institute of Medicine (US), 2011; Institute of Medicine (US), 2001).

Los grupos poblacionales en los cuales los requisitos de hierro y de calcio son especialmente altos son: bebés, niños, adolescentes, mujeres en edad fértil y embarazadas (Kochanowski y McMahan, 1990; Glerup y col., 1995; Dasa y Abera, 2018). Ingestas inadecuadas de estos minerales pueden producir consecuencias negativas para la salud, como anemia y osteoporosis (Benkhedda y col., 2010; Candia y col., 2018).

Una alternativa para prevenir la deficiencia de hierro y aumentar la ingesta de calcio sería el desarrollo de un suplemento que contenga ambos micronutrientes (Mølgaard y col., 2005; Herrera y col., 2015). Pero el consumo de suplementos con alto contenido de calcio o altas concentraciones de este micronutriente de la dieta podría afectar la biodisponibilidad del hierro, ya que existe evidencia que sugiere un efecto inhibitorio de dosis bajas de calcio sobre la absorción de hierro en humanos (Roughead y col., 2005; Deehr y col., 1990; Cook y col., 1991; Glerup y col., 1995; Minihane y Fairweather-Tait, 1998; Candia y col., 2018), animales (Kochanowski y McMahan, 1990; Wienk y col., 1996; Wauben y Atkinson, 1999; Silva y col., 2017), así como en células Caco-2 y ovocitos de *Xenopus* (Shawki y Mackenzie, 2010; Lönnerdal, 2010; Thompson y col., 2010). El efecto inhibitorio observado del calcio es preocupante, ya que los grupos de población en los que se recomienda el uso de suplementos de calcio son los mismos grupos que están en riesgo de deficiencia de hierro (Grinder-Pedersen y col., 2004; Hurrell y Egli, 2010) y con la suplementación o en una dieta rica en calcio, las concentraciones de calcio luminal intestinal alcanzan periódicamente el rango milimolar (Shawki y Mackenzie, 2010).

Sin embargo, las investigaciones realizadas hasta ahora para analizar el efecto del calcio sobre la absorción de hierro han presentado resultados contradictorios entre sí. Los inconsistentes resultados observados en los indicadores del estado del hierro durante el proceso de absorción de hierro en presencia de calcio pueden explicarse por diversos factores (Minihane y Fairweather-Tait, 1998; Monsen y Cook, 1976; McKie y col., 2000).

En estudios con humanos, se debe considerar que las comidas pueden contener potenciadores de la absorción de hierro (como la carne o el ácido ascórbico) que pueden ayudar a superar el efecto inhibitorio del calcio, o inhibidores de la absorción de hierro (como el fitato) que pueden provocar el efecto inhibitorio asociado al calcio (Cook y col., 1991; Grindler-Pedersen y col., 2004; Abrams y col., 2001; Mendoza y col., 2004; Walczyk y col., 2014). Además, al analizar los resultados de los estudios en animales, se debe tener en cuenta que los roedores y lechones sintetizan ácido ascórbico de forma endógena y, por lo tanto, se ven menos afectados por los inhibidores de la absorción de hierro de la dieta que los humanos (Sharp y Srai, 2007; Perfecto y col., 2017).

Se desconoce el mecanismo por el cual el calcio podría ejercer un efecto inhibitorio sobre la absorción de hierro. Algunos investigadores sugieren que el hierro hemo y el hierro no hemo forman una reserva común de hierro en el enterocito y que el calcio ejerce sus efectos antagónicos al disminuir la transferencia de hierro al plasma a través de la membrana basolateral del enterocito, induciendo la relocalización transitoria de la ferroportina (FPN) en una ubicación intracelular (Lönnerdal, 2010). Otros proponen que el efecto inhibitorio del calcio tiene lugar durante la fase inicial de captación de hierro, por modulación alostérica del Transportador de Metal Divalente 1 (DMT1), a través de una inhibición no competitiva (Shawki y Mackenzie, 2010; Hallberg y col., 1993) o por modificación de la expresión y localización de DMT1 (Roughead y col., 2005; Thompson y col., 2010; Hurrell y Egli, 2010), lo que reduce la captación inicial de hierro en el enterocito. Por lo tanto, los esfuerzos dirigidos a comprender cómo el calcio puede afectar la absorción de hierro y si este efecto altera los niveles de hierro intracelular son de gran relevancia, ya que una mejor comprensión de esta interacción calcio-hierro permitirá el desarrollo de estrategias más efectivas para la formulación de suplementos y la fortificación de alimentos.

El mecanismo cinético básico para la inhibición no competitiva de una enzima se puede representar como un ciclo formado por un número finito de estados discretos (Voet y Voet, 2010; Blat, 2010; Bhagavan y Ha, 2015). Las transiciones entre estados pueden estar asociadas con interacciones con sustratos, productos, inhibidores o cambios conformacionales (Hill, 1977). En este capítulo se propone un modelo basado en estados que tiene en cuenta los principales componentes biológicos del sistema de transporte de hierro, con el fin de estudiar el efecto inhibitorio del calcio sobre el proceso de absorción intestinal de hierro en células Caco-2. El modelo considera un mecanismo de cuatro estados para describir el sistema de transporte DMT1 para capturar la dinámica de fluorescencia de calceína observada. Experimentalmente, se encontró que el calcio media la inhibición de la captación de hierro de manera reversible. Además, se demostró que el efecto inhibitorio del calcio no se ejerce a través de la señalización intracelular. Los resultados de la simulación del modelo propuesto muestran que el efecto del calcio en DMT1 es consistente con una modulación alostérica.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Cultivo de células

La línea celular de carcinoma de colon humano (Caco-2) [HTB-37, American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD] se utilizó como modelo de enterocitos intestinales para este estudio. Las células Caco-2 forman una monocapa altamente diferenciada y polarizada, que expresa transportadores de nutrientes como DMT1 y FPN,

enzimas, uniones estrechas y microvellosidades, por lo que presenta características semejantes a las de los enterocitos intestinales maduros, (Ma y col., 2002; Beck y Coad, 2017; Sambuy y col., 2005). Estas células permiten el estudio de los mecanismos de absorción intestinal, independientemente de la matriz alimentaria, y los resultados obtenidos en este sistema modelo están en buena concordancia con la absorción observada en animales y humanos (Herrera y col., 2015; Yun y col., 2004). Es por ello que en la lista de métodos aceptados por la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos (FDA) para determinar la clase de permeabilidad de un fármaco y predecir su absorción, aparece este modelo (Department of Health and Human Services y col., 2017). En un estado de privación de hierro, DMT1 se puede encontrar principalmente en el ribete en cepillo de la membrana apical de ratas, humanos y células Caco-2 (Scheers, 2013; Ma y col., 2006b).

Las células Caco-2 se cultivaron en DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco™) suplementado con 7 g/L de NaHCO₃, suero bovino fetal (SBF, HyClone™) al 10 % v/v y solución antibiótica (penicilina-G) y antifúngica (estreptomocina) (Pen/Strep, Gibco™) al 1 % v/v. El medio se esterilizó por filtración con membrana con tamaño de poro de 0.22 μm y se guardó a 4 °C. Las células se mantuvieron a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂ y 95% de aire. El medio de cultivo fue reemplazado cada dos días. Para limitar la variabilidad de los experimentos, el rango del número de pasajes celulares utilizados se mantuvo por debajo de 15.

2.2.2 Fuente de hierro

En todos los experimentos se usó sulfato de amonio ferroso (FAS, Sigma-Aldrich®) como fuente de hierro ferroso, una forma de hierro inorgánico que se emplea ampliamente en programas clínicos y de suplementos de hierro (Esparza y col., 2015). El sulfato ferroso es soluble tanto a pH neutro como gástrico, mientras que los compuestos de hierro utilizados en la fortificación de alimentos como el fosfato de amonio ferroso y el pirofosfato férrico (FPP) son poco solubles a pH neutro (Walczyk y col., 2003).

Dado que no se requiere una reducción previa, FAS está directamente disponible para ser captado por las células Caco-2, lo que elimina la necesidad de usar ácido ascórbico para reducir el hierro férrico (Fe³⁺) a ferroso (Fe²⁺) (Teucher y col., 2004; Hallberg y col., 1993), lo que podría tener un efecto en los resultados experimentales, ya que se ha demostrado que el ácido ascórbico reduce el efecto negativo de los inhibidores durante la absorción de hierro, incluido el efecto del calcio (Hurrell y Egli, 2010).

En los experimentos realizados en este trabajo, las células se expusieron a FAS durante aproximadamente 30 minutos, un período de tiempo en el cual no se espera que se produzca oxidación de hierro ferroso (Fe²⁺) a férrico (Fe³⁺), ya que se ha reportado para diferentes líneas celulares que las células pueden exponerse a FAS en medios libres de suero durante más de dos horas sin oxidación significativa de Fe²⁺ a Fe³⁺ (Deb y col., 2009; Aron y col., 2017; Spangler y col., 2016). La solución de FAS se preparó inmediatamente antes de su uso, con agua recién hervida para reducir el contenido de oxígeno de la solución, y se mantuvo en un tubo cerrado para limitar la exposición al oxígeno (Montalbetti y col., 2015). Además, no se observó ningún cambio en el color de los medios expuestos a FAS, lo que también sería una indicación de la oxidación del hierro (Park y col., 2019; Alorabi y col., 2019).

Para preparar la solución de FAS, se tomó una pequeña cantidad de FAS (menor a 0,1 g), se determinó su masa, y luego se calculó el número de moles presentes, considerando que el peso molecular del FAS es de 392,1 *g/mol*, utilizando la Ecuación 2.1:

$$n_{\text{moles}} = \text{FAS (g)} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{392,1 \text{ g}} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

Luego, FAS se disolvió en el volumen apropiado de agua recién hervida (para reducir la concentración de oxígeno) hasta alcanzar la concentración de FAS deseada, y se mantuvo en un recipiente sellado para limitar la exposición al oxígeno. Por ejemplo, para preparar una solución concentrada de 200 μM de FAS, el volumen de agua necesario viene dado por:

$$V_{\text{Agua hervida}} (\mu\text{L}) = n_{\text{moles}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{200 \mu\text{M}} \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

2.2.3 Fuente de calcio

El cloruro de calcio (CaCl_2 , Winkler Ltda), una sal de calcio comúnmente presente en los medios de cultivo celular, se utilizó como fuente de Ca^{2+} . Esta sal inorgánica, muy utilizada en la industria alimentaria, es altamente disociada en el tracto gastrointestinal (Kalgaonkar y Lönnnerdal, 2008; Gaitán y col., 2011). Por lo tanto, se espera que el mayor efecto del Ca^{2+} sobre la captación de Fe^{2+} se observe en este entorno experimental.

En el diseño experimental propuesto, se evaluó si la ingesta dietética recomendada por el Instituto de Medicina (EE. UU.) de hierro (18 *mg/día*) (Institute of Medicine (US), 2001) y calcio (1000 *mg/día*) (Institute of Medicine (US), 2011), equivalente a una relación másica de calcio:hierro de aproximadamente 56:1, suministrada en una sola comida, podría afectar negativamente la captación de hierro. Para ello se utilizó 10 μM de FAS y se redujo la concentración de Ca^{2+} del medio MEM de 1,8 *mM* a 1,5 *mM* suplementándolo con 0,3 *mM* de EGTA, para lograr la relación másica indicada anteriormente (sección A.1.2 de Anexos).

Se ha informado que la eliminación completa del Ca^{2+} del medio de cultivo extracelular origina una rápida caída de la resistencia epitelial en las células Caco-2, debido principalmente a la pérdida de las uniones estrechas (Ma y col., 2000). Sin embargo, muchas líneas celulares pueden mantenerse en cultivo con bajas concentraciones de calcio (10 a 50 μM), con conservación de la viabilidad celular y características de proliferación (Gigout y col., 2005; Davies y col., 2008; Fujisaki y col., 2018). Considerando esto, se estableció 10 μM de Ca^{2+} como la concentración de calcio más baja para este sistema experimental, obtenido utilizando medio MEM suplementado con 1,9 *mM* de EGTA (sección A.1.1 de Anexos).

El proceso de absorción de calcio es el resultado de dos procesos, el transporte activo que tiene lugar predominantemente en el duodeno y el yeyuno superior, y la difusión pasiva, que tiene lugar en el yeyuno distal y el íleon (Weaver y Heaney, 2006; Herrera y col., 2015). A medida que aumenta la ingesta de calcio, el transporte activo se satura y la difusión pasiva se convierte en el mecanismo predominante de absorción de calcio (Pu y col., 2016; Guéguen y Pointillart, 2000). Sin embargo, se esperaría que esto ocurra a concentraciones superiores a 12 *mM* (Phoaubon y col., 2021). Considerando esto, para evaluar el impacto que tendría en la captación de hierro duplicar la concentración de calcio

recomendada, se complementó el medio MEM con Ca^{2+} hasta una concentración final de 3 mM (sección A.1.3 de Anexos).

2.2.4 Entrada de hierro en el grupo de hierro lábil citoplasmático

Se utilizó un ensayo de fluorescencia basado en el fluoróforo sensible a los metales calceína para rastrear la entrada de hierro en el grupo de hierro lábil citosólico (cLIP).

La Calceína-AM (Invitrogen-Life Technologies™) no fluorescente es captada por las células como ésteres e hidrolizada por las esterasas intracelulares a calceína, una sonda con fluorescencia verde, que reside dentro de las células con muy poca fuga siempre que se mantenga la integridad celular (Brown y col., 2004; San Martín y col., 2008). La Calceína-AM se deriva de una calceína en la que los cuatro hidrógenos del grupo carboxilo se sustituyen por grupos (acetiloxi)metoxi y los hidrógenos de los dos grupos hidroxilo se sustituyen por grupos acetilo (Braut-Boucher y col., 1995; Miles y col., 2015).

La calceína no se une a los iones Ca^{2+} o Mg^{2+} a pH fisiológico y la concentración citosólica de los metales a los cuales la calceína es sensible (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} y Mn^{2+}) es relativamente baja (Brown y col., 2004). Por lo tanto, la extinción de la fluorescencia de calceína en presencia de una fuente extracelular de hierro se puede utilizar para detectar dinámicamente la entrada de hierro en el grupo de hierro lábil citosólico (cLIP) (Kakhlon y Cabantchik, 2002; Garrick y col., 2003; Breuer y col., 2008). La calceína en el citosol no es permeable a los compartimentos celulares limitados por membrana; por lo tanto, la extinción de la fluorescencia de la calceína proporciona una medida de la entrada de hierro en el grupo de hierro lábil citosólico (cLIP), pero no de la entrada de hierro en el grupo de hierro lábil celular total (Tenopoulou y col., 2007). Sin embargo, después de ingresar a través de la membrana de ribete de cepillo (BBM) del enterocito, la mayor parte del hierro primero se convierte en parte del cLIP antes de almacenarse en ferritina o transferirse al torrente sanguíneo por FPN (Andrews, 2008; Brown y col., 2004); además, se ha observado que el cLIP de las células aumenta dinámicamente en respuesta a un desafío de hierro. Por esta razón, la extinción de la fluorescencia de la calceína se considera una medida relativa del contenido de hierro celular total, ya que cLIP puede usarse como marcador de este contenido (Kakhlon y Cabantchik, 2002; Arredondo y Núñez, 2005). Teniendo esto en cuenta, el cLIP se utilizó como un indicador indirecto de la absorción de hierro celular después de que las células fueran desafiadas con hierro (10 μM de FAS), utilizando calceína como reportero, para analizar el efecto de este desafío de hierro cuando las concentraciones de calcio extracelular son 10 μM , 1,5 mM o 3 mM de CaCl_2 .

Para determinar entrada de hierro en el cLIP a través de la medición de la fluorescencia de calceína, se utilizó la metodología descrita a continuación:

1. Se sembraron las células Caco-2 en placas de 24 pocillos (Falcon®) a una densidad de 15.000 células por pocillo y se cultivaron durante 7-8 días en DMEM con SBF al 10%, con cambio de medio cada 2 días.
2. 24 horas antes de realizar los experimentos, las células se incubaron en MEM sin rojo fenol (Thermo Fisher Scientific) con SBF al 2%, para maximizar la ubicación de DMT1 en la membrana apical.
3. Luego de retirar el medio de cultivo, se cargó Calceína-AM a una concentración de 1 μM durante 15 minutos a 37 °C en MEM sin rojo fenol con 10 μM de CaCl_2 . Se

usó MEM con 10 μM de $CaCl_2$ para aislar cualquier efecto del calcio extracelular en la dinámica de internalización de la calceína.

4. Después de la carga, las células se lavaron dos veces con PBS (Thermo Fisher Scientific) para remover la calceína no internalizada, y se añadieron a los pocillos 190 μL de MEM sin rojo fenol, suplementados con 10 μM , 1,5 mM o 3 mM de cloruro de $CaCl_2$. Las mediciones de fluorescencia se obtuvieron a 37 °C en un Fluorómetro de Microplacas Fluoroskan™ (Fluoroskan Ascent®), usando longitudes de onda de excitación y emisión de 485 nm y 528 nm, respectivamente.
5. Después de registrar durante 3 minutos la fluorescencia basal, se añadió sulfato de amonio ferroso (FAS) a cada pocillo a una concentración final de 10 μM y se midieron los cambios en la fluorescencia de la calceína durante los siguientes 30 minutos.
6. Se realizaron experimentos para cada condición experimental, con $n = 12$ pocillos y tiempo de medición cada 33,6 segundos para utilizarlos como el conjunto de entrenamiento del modelo (61 observaciones experimentales por pocillo), y con $n = 8$ pocillos y tiempo de medición cada 25,3 segundos para utilizarlos como el conjunto de prueba del modelo (63 observaciones experimentales por pocillo). Los valores se expresan como medición de fluorescencia (F) menos la media de la línea de base de fluorescencia antes de la exposición al hierro (F_0), calculada como ($F - F_0$).

2.2.5 Entrada de hierro en el grupo de hierro lábil citosólico después de la quelación del calcio intracelular

Con el fin de determinar, a través de la medición del decaimiento de la fluorescencia de la calceína, si el efecto inhibitor del calcio sobre la captación de hierro se ejerce a través de la señalización intracelular de calcio, se utilizó BAPTA-AM (Invitrogen-Molecular Probes™) para el agotamiento del Ca^{2+} intracelular en las células Caco-2.

BAPTA que es un quelante altamente selectivo de las reservas intracelulares de Ca^{2+} y su unión a metales es menos sensible al pH comparado con EDTA y EGTA (Zhu y col., 2005; Bozym y col., 2010; Cajnko y col., 2015). BAPTA no puede formar complejos con el grupo de hierro lábil citosólico y, por lo tanto, no disminuye la fluorescencia intracelular de la calceína (Berchner-Pfannschmidt y col., 2004). BAPTA-AM es un permeante celular derivado del éster acetoximetílico de BAPTA, en el que los hidrógenos del grupo carboxilo de BAPTA han sido sustituidos por grupos (acetiloxi)metoxi, dando como resultado una molécula sin carga que puede penetrar las membranas celulares (Wie y col., 2001; Bozym y col., 2010; Cajnko y col., 2015). Dentro de la célula, estos grupos se escinden por actividad de esterasas no específicas, quedando BAPTA en su forma libre.

Para quelar el calcio intracelular de las células Caco-2 y posteriormente determinar de la fluorescencia de calceína, se siguió la siguiente metodología:

1. Las células Caco-2 se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 15.000 células por pocillo y se cultivaron durante 7-8 días en DMEM con SBF al 10 %, con un cambio de medio cada 2 días.
2. 24 horas antes de realizar los experimentos, las células se privaron de hierro incubándolas en MEM sin rojo fenol con SBF al 2%.

3. Después de 24 horas en medio bajo en hierro, las células se lavaron dos veces con PBS y BAPTA-AM se cargó a una concentración final de 20 μM durante 30 minutos a 37 °C en MEM sin rojo de fenol con 10 μM de CaCl_2 .
4. Una vez quelado el calcio intracelular, se retiró el medio, se cargó la Calceína-AM y se midió su fluorescencia como se describió en la sección anterior desde el numeral 4, con el mismo número de repeticiones para cada condición experimental considerada.

2.2.6 Capacidad amortiguadora de BAPTA después de la elevación de la concentración de calcio citosólico con Tapsigargina

La tapsigargina (TAP, Calbiochem®) es un inhibidor altamente selectivo de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA) que agota las reservas de Ca^{2+} intracelular a través de una transferencia neta de Ca^{2+} desde el retículo sarcoendoplásmico al citosol y, por lo tanto, eleva la concentración de Ca^{2+} intracelular (Vostal y Shafer, 1996; Yoshida y col., 2006; Nakano y col., 2006; Bozym y col., 2011). Además, el agotamiento de las reservas de Ca^{2+} activa un proceso llamado entrada de Ca^{2+} capacitativa (CCE), en el cual se estimula el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los canales de calcio de la membrana plasmática (Nakano y col., 2006; Putney y col., 2001).

El éster Fluo-3-AM (Invitrogen-Molecular Probes™), una forma permeable a las células de Fluo-3, cuya fluorescencia aumenta en presencia de Ca^{2+} libre (Cui y col., 2015; Jia y col., 2021), se utilizó como indicador de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) de las células Caco-2. El aumento de la intensidad de la fluorescencia de Fluo-3 es proporcional al aumento del calcio intracelular (Estrada y col., 2005). Para atenuar el Ca^{2+} citosólico, las células se cargaron con BAPTA-AM antes de la estimulación con TAP (Yoshida y col., 2006; Maloney y col., 1999).

La evaluación de la capacidad de BAPTA de quelar el Ca^{2+} citosólico, luego de elevar su concentración utilizando TAP, se realizó siguiendo la metodología descrita a continuación:

1. Las células Caco-2 se sembraron en placas de 48 pocillos (Corning Costar®) a una densidad de 7.000 células por pocillo y se cultivaron durante 7-8 días en DMEM suplementado con SBF al 10 %, con un cambio de medio cada 2 días.
2. 24 horas antes de los experimentos, las células se incubaron en DMEM con SBF al 2%. Luego de estas 24 horas, las células se lavaron con PBS para eliminar el suero.
3. Fluo-3-AM se cargó en la oscuridad a una concentración final de 10 μM , con o sin BAPTA-AM a concentración de 20 μM . Fluo-3 se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en MEM sin rojo fenol con 10 μM de CaCl_2 .
4. Después de la carga de Fluo-3, las células se lavaron dos veces con PBS y se añadió a los pocillos MEM (sin rojo fenol) con 10 μM , 1,5 mM o 3 mM de CaCl_2 , seguido de un período de recuperación de 10 minutos en la oscuridad a 37 °C para permitir la desesterificación del colorante.
5. Las mediciones de fluorescencia se obtuvieron a 37 °C utilizando un lector de placas Synergy 2 (BioTek®), usando longitudes de onda de excitación y emisión de 485 nm y 516 nm, respectivamente.
6. Luego de registrar la lectura de fluorescencia basal durante 5 minutos, se añadió tapsigargina a cada pocillo a una concentración final de 5 μM , y los cambios en la intensidad de fluorescencia de Fluo-3 se monitorearon durante 15 minutos. Las

células cargadas con Fluo-3, con o sin BAPTA-AM, en las que no se añadió tapsigargina, se utilizaron como grupo de control. Cada condición experimental se realizó por tetraplicado. Los valores se expresan como la intensidad de la fluorescencia de Fluo-3 (F) en relación con el promedio de las primeras cuatro mediciones de fluorescencia basal (F_0), calculados como F/F_0 .

2.2.7 Entrada de hierro en grupo de hierro lábil citosólico después de la preincubación con calcio

Cuando la inhibición es reversible, el efecto de un inhibidor se puede revertir al disminuir la concentración del inhibidor.

Para estudiar la reversibilidad de los efectos del calcio extracelular, se utilizó la siguiente metodología:

1. Se sembraron y cultivaron las células Caco-2 en placas de 24 pocillos, y se cargó la Calceína-AM como se describió en las secciones anteriores.
2. Luego de realizar la carga de la calceína, las células se lavaron dos veces con PBS y luego se incubaron durante 10 minutos en MEM sin rojo fenol, suplementado con $10\ \mu\text{M}$, $1,5\ \text{mM}$ o $3\ \text{mM}$ de CaCl_2 .
3. Después de la preincubación con calcio, las células se lavaron rápidamente 2 veces con PBS y se añadió a los pocillos MEM sin rojo fenol con $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 , seguido de un período de recuperación de 10 minutos.
4. Las mediciones de fluorescencia se obtuvieron a $37\ ^\circ\text{C}$ en un lector de placas Synergy 2 (BioTek®), usando longitudes de onda de excitación y emisión de 485 nm y 528 nm, respectivamente. Después de tomar la lectura de fluorescencia basal durante 3 minutos, se añadió FAS a una concentración final de $10\ \mu\text{M}$ y se continuó con la medición de la fluorescencia de calceína durante aproximadamente 30 minutos.
5. En cada conjunto de experimentos se realizaron experimentos de control positivo y negativo de la inhibición de la captación de hierro mediada por calcio. En cada grupo de control, se omitió el paso de lavado después de la preincubación y se añadió $10\ \mu\text{M}$ de FAS en presencia de $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 para el control negativo, o en presencia de $1,5\ \text{mM}$ o $3\ \text{mM}$ de CaCl_2 para los controles positivos. Se realizaron experimentos para cada condición experimental con $n = 4$, y con $n = 2$ para cada control.

2.2.8 Análisis estadístico

Los datos se presentan como *media* \pm *desviación estándar* (D.E.) de un número dado de experimentos independientes. La significación estadística entre los datos observados en dos condiciones experimentales (grupos) se determinó mediante la prueba t de Student de dos colas (Markowski y Markowski, 1990; Guo y Yuan, 2015). Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras para probar si dos grupos diferentes provienen de la misma distribución (hipótesis nula) o no (hipótesis alternativa) (Steele y Chaseling, 2006; Smirnov, 1939; Facchinetti, 2009; Knuth, 1997). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en todas las pruebas con un valor de $p < 0,05$.

2.3 Resultados y Discusión

2.3.1 Inhibición de la entrada de hierro grupo de hierro lábil citosólico (cLIP) por el calcio

Se investigó el efecto de aumentar las concentraciones de calcio extracelular ($10 \mu\text{M}$, $1,5 \text{ mM}$ o 3 mM de Ca^{2+}) en el cLIP de células Caco-2 desafiadas con $10 \mu\text{M}$ de FAS, utilizando calceína como sensor para la entrada de hierro en el cLIP.

Antes de la adición de FAS, la extinción de la calceína era inferior al 5 % de la fluorescencia inicial, incluso cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular se quelaba con BAPTA (Figura 2.1, (A) y (B), la adición de FAS se indica con la flecha). Esto demuestra que se mantiene la integridad de la membrana celular y que las concentraciones de Ca^{2+} extracelular utilizadas no provocaron una disminución de la fluorescencia de la calceína. La adición de $10 \mu\text{M}$ de FAS resultó en el decaimiento de la fluorescencia de la calceína, lo que indica la entrada de hierro en el cLIP. Sin embargo, el decaimiento de la fluorescencia exhibió una dinámica diferente según la concentración de calcio utilizada.

Como se muestra en la Figura 2.1, el decaimiento de la fluorescencia de la calceína en respuesta a un desafío con hierro es más pronunciado cuando la concentración de Ca^{2+} extracelular es de $10 \mu\text{M}$, y la magnitud de este decaimiento a lo largo del experimento depende de la concentración de calcio utilizada. Por lo tanto, estos datos muestran que el calcio extracelular inhibe efectivamente la entrada de hierro en el cLIP de las células Caco-2 de manera dependiente de la concentración.

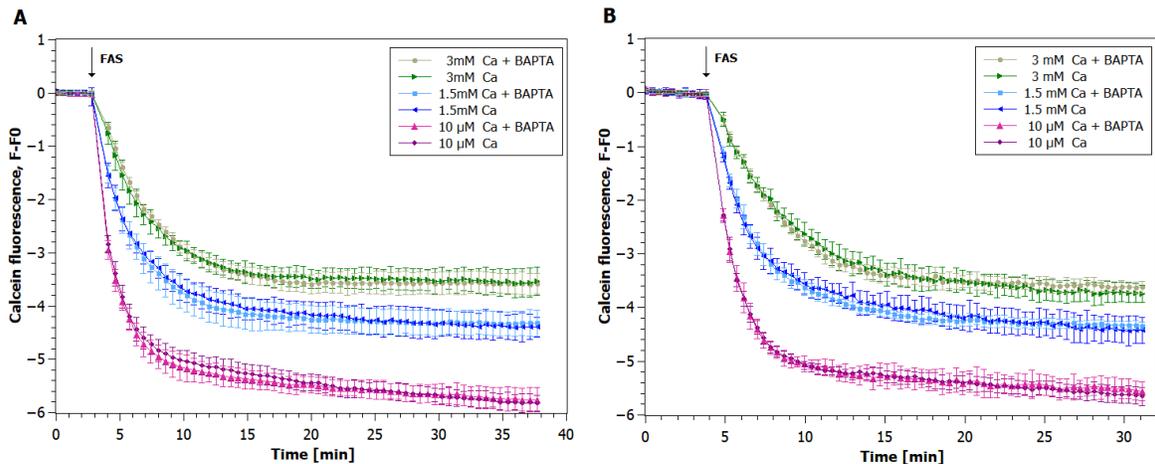


Figura 2.1. Registros de fluorescencia de extinción de calceína inducida por $10 \mu\text{M}$ de FAS, cuando la concentración de calcio extracelular era de $10 \mu\text{M}$ (líneas moradas, \blacktriangle y \blacklozenge) o 3 mM (líneas verdes, \bullet y \blacktriangleright) de Ca^{2+} . La carga de calceína se realizó en MEM sin rojo fenol, reduciendo la concentración de este medio a $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 con EGTA. Los valores se expresan como $F-F_0$, donde F es la medida de la fluorescencia y F_0 es la media de la fluorescencia de referencia antes de la exposición al hierro. (A) Conjunto de entrenamiento: mediciones realizadas cada 33,6 segundos. Los resultados experimentales se presentan como *media* \pm D.E. de 12 pocillos. (B) Conjunto de prueba: mediciones realizadas cada 25,3 segundos. Los resultados experimentales se presentan como *media* \pm D.E. de 8 pocillos.

La tasa de absorción de hierro muestra una dependencia evidente con la concentración de calcio en el medio extracelular. Para cada condición experimental representada en la Figura 2.1B, los modelos lineales que aproximan la derivada temporal de las mediciones experimentales después de la adición de FAS se obtuvieron a través del método de la secante (Allen e Isaacson, 1998); estos modelos se ajustan a los dos primeros

datos de fluorescencia después de agregar FAS y se presentan en la [Tabla 2.1](#). Las tasas de cambio obtenidas son mayores (en valor absoluto) para la adición de FAS en el medio con $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} . Esto implica que la tasa de entrada de hierro en el cLIP es menor para concentraciones extracelulares más altas de Ca^{2+} .

Usando la prueba t de Student de dos colas ([Markowski y Markowski, 1990](#); [Guo y Yuan, 2015](#)), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las mediciones de fluorescencia de calceína para células preincubadas o no con BAPTA-AM. Además, la comparación de estos dos grupos de células con la prueba de Kolmogorov-Smirnov ([Steele y Chaseling, 2006](#); [Smirnov, 1939](#); [Facchinetti, 2009](#); [Knuth, 1997](#)) mostró que las mediciones obtenidas con y sin preincubación con BAPTA-AM pertenecen a la misma distribución y, por lo tanto, pueden considerarse como un solo grupo. Esto indica que la quelación del Ca^{2+} intracelular no afecta la dinámica de la entrada de hierro en el cLIP. Sin embargo, al comparar las mediciones de fluorescencia de calceína entre células expuestas a dos concentraciones extracelulares diferentes de Ca^{2+} ($10 \mu\text{M}$ vs. $1,5 \text{ mM}$, $10 \mu\text{M}$ vs. 3 mM , o $1,5 \text{ mM}$ vs. 3 mM) preincubadas o no con BAPTA-AM, utilizando la prueba t de Student, se observó que las medidas son estadísticamente diferentes en todos los casos ante un desafío con $10 \mu\text{M}$ de FAS, y la prueba de Kolmogorov-Smirnov indicó que no pertenecen a la misma distribución.

El efecto inhibitorio del calcio sobre la captación de hierro se hace evidente, incluso cuando este micronutriente se encuentra en una concentración similar a la que se encuentra en los medios de cultivo estándar ($1,5 \text{ mM}$ de Ca^{2+}). Como se muestra en la [Figura 2.1B](#), esto también se observa cuando el calcio intracelular se quela con BAPTA, lo que indica que el efecto inhibitorio del calcio no se ejerce a través de los mecanismos de señalización del calcio intracelular.

Tabla 2.1. Modelos lineales del decaimiento de la fluorescencia de la calceína debido a un desafío de hierro ($10 \mu\text{M}$ de FAS). Estos modelos se ajustan a los dos primeros datos de fluorescencia después de agregar FAS. f representa la fluorescencia de la calceína ($F - F_0$) y t es el tiempo en minutos.

$[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular	sin preincubación con BAPTA-AM	con preincubación con BAPTA-AM	promedio de los dos casos
$10 \mu\text{M Ca}^{2+}$	$f = -2,0131 \cdot t$ $R^2 = 0,9938$	$f = -2,0274 \cdot t$ $R^2 = 0,9959$	$f = -2,0203 \cdot t$ $R^2 = 0,9949$
$1,5 \text{ mM Ca}^{2+}$	$f = -1,1272 \cdot t$ $R^2 = 0,9972$	$f = -1,0782 \cdot t$ $R^2 = 0,9982$	$f = -1,1027 \cdot t$ $R^2 = 0,9983$
3 mM Ca^{2+}	$f = -0,5484 \cdot t$ $R^2 = 0,9661$	$f = -0,5311 \cdot t$ $R^2 = 0,9787$	$f = -0,5398 \cdot t$ $R^2 = 0,9732$

2.3.2 Efecto de BAPTA y Tapsigargina en la concentración de Ca^{2+} intracelular

Era necesario asegurar que BAPTA produce un efecto amortiguador del Ca^{2+} intracelular cuando las células Caco-2 se exponen a altas concentraciones de Ca^{2+} extracelular, para descartar la posibilidad de que el efecto inhibitorio del calcio observado en el transporte de hierro se deba al aumento de la concentración de calcio intracelular secundario a un aumento de la concentración de calcio extracelular. Con este fin, se utilizó tapsigargina (TAP) para aumentar la concentración de Ca^{2+} intracelular y así evaluar el efecto quelante de BAPTA-AM sobre el calcio citosólico en células Caco-2 ([Figura 2.2](#)). Fluo-3, cuya fluorescencia aumenta en presencia de Ca^{2+} libre, se utilizó como indicador de la concentración de Ca^{2+} intracelular.

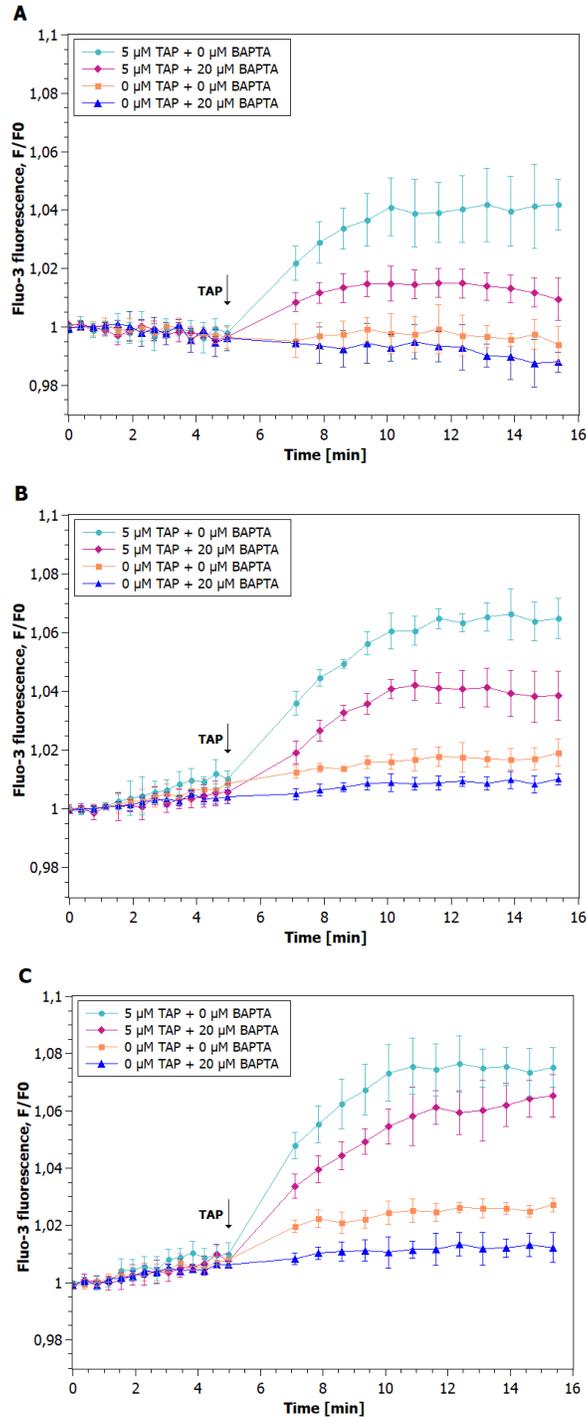


Figura 2.2. Efecto de 5 μM de TAP en la concentración de calcio intracelular, cuando la sonda Fluo-3 se carga en células Caco-2 en presencia o ausencia de BAPTA-AM 20 μM . Después de cargar Fluo-3, se agregó MEM con (A) 10 μM , (B) 1,5 mM, o (C) 3 mM de Ca^{2+} . Se registró una línea de base durante 5 minutos, y luego se aplicó TAP a las células cargadas (rojo violeta \blacklozenge) o no (verde \bullet) con BAPTA-AM. Los grupos de control son pocillos con células cargadas con Fluo-3, con (azul \blacktriangle) o sin (naranja \blacksquare) BAPTA-AM, en los que no se añade TAP. Los datos se expresan como F/F_0 , valores de fluorescencia en un momento determinado (F) divididos por la media de las primeras cuatro mediciones de fluorescencia de referencia (F_0). Los resultados experimentales se presentan como *media* \pm D.E. de 4 pocillos. Se añadió TAP en los tiempos indicados por la flecha. Las mediciones de fluorescencia se obtuvieron en un lector de placas Synergy 2 (BioTek®).

Cuando la concentración de Ca^{2+} extracelular fue de $10\ \mu\text{M}$ y se omitió el desafío de TAP, la fluorescencia de Fluo-3 se mantuvo muy cerca de su valor inicial durante todo el experimento, lo que indica que la concentración de Ca^{2+} intracelular permaneció sin cambios (Figura 2.2A, datos naranja y azul). En ausencia de TAP y BAPTA, la fluorescencia de Fluo-3 aumentó un 2 % y un 2,7 % cuando la concentración de Ca^{2+} extracelular fue $1,5\ \text{mM}$ o $3\ \text{mM}$ respectivamente (Figura 2.2, (B) y (C), datos naranjas). Sin embargo, estos aumentos fueron del 1 % y 1,2 % cuando las células se preincubaron con BAPTA-AM (Figura 2.2, (B) y (C), datos azules), y todas las mediciones son estadísticamente diferentes de las obtenidas en ausencia de BAPTA-AM. Esto indica que las altas concentraciones de Ca^{2+} extracelular inducen una entrada de Ca^{2+} , que se amortigua de manera efectiva al preincubar las células con $20\ \mu\text{M}$ de BAPTA-AM.

La adición de $5\ \mu\text{M}$ de TAP en ausencia de BAPTA-AM y en presencia de $10\ \mu\text{M}$, $1,5\ \text{mM}$ o $3\ \text{mM}$ de calcio extracelular, produjo un aumento del 4,2 %, 6,6 % y 7,6 % en la fluorescencia de Fluo-3, respectivamente (Figura 2.2, (A), (B) y (C), datos verdes). La acumulación de Ca^{2+} intracelular inducida por TAP aumentó significativamente por encima de los niveles de control (caso sin TAP) para cada concentración de Ca^{2+} estudiada, y esta diferencia se observó inmediatamente después de la adición de TAP. Cuando las células se cargaron con $20\ \mu\text{M}$ de BAPTA-AM y la concentración de Ca^{2+} extracelular fue igual a $10\ \mu\text{M}$ o $1,5\ \text{mM}$ de CaCl_2 , la elevación de la concentración de Ca^{2+} intracelular se atenuó significativamente después del tratamiento con $5\ \mu\text{M}$ de TAP (Figura 2.2, (A) y (B), datos violetas), aumentando hasta un 1,5 % y un 4,2 % en cada caso en comparación con las células no cargadas con BAPTA-AM. Con $3\ \text{mM}$ de Ca^{2+} extracelular, los efectos amortiguadores de BAPTA-AM son insignificantes 5 minutos después de la adición de TAP (Figura 2.2 (C), datos violetas).

Esto demuestra que BAPTA amortigua eficazmente el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular después de la adición de TAP y en presencia de una alta concentración de Ca^{2+} extracelular. Cuando no se agrega TAP, BAPTA mantiene el aumento de la fluorescencia de Fluo-3 cerca del 1 %, lo que representa una reducción estadísticamente significativa en los niveles de Ca^{2+} intracelular en comparación con el caso en que BAPTA no está presente. En base a estos resultados se concluye que el efecto inhibitorio del Ca^{2+} observado en el apartado anterior no se ejerce a través de mecanismos de señalización intracelular.

2.3.3 El calcio es un inhibidor reversible de la captación de hierro

Cuando la inhibición es reversible, el efecto de un inhibidor se puede revertir al disminuir la concentración del inhibidor (Montalbetti y col., 2015). Teniendo en cuenta que se ha demostrado que el calcio extracelular inhibe la captación de hierro en las células Caco-2, se estudió la reversibilidad de este efecto inhibidor.

Como se muestra en la Figura 2.3, no se observaron diferencias significativas en la captación de hierro entre las células preincubadas con $10\ \mu\text{M}$, $1,5\ \text{mM}$ o $3\ \text{mM}$ de Ca^{2+} , lavadas con PBS después de la preincubación y posteriormente incubadas con $10\ \mu\text{M}$ de Ca^{2+} . Cuando se omitió el paso de lavado después de la preincubación de las células con $10\ \mu\text{M}$ de Ca^{2+} (control negativo), tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a las mediciones de fluorescencia de calceína en comparación con las células que se preincubaron con diferentes concentraciones de Ca^{2+} y posteriormente se lavaron. Por otro lado, cuando las células Caco-2 se preincubaron con $1,5\ \text{mM}$ o $3\ \text{mM}$ de Ca^{2+} y se omitió el

paso de lavado después de la preincubación (control positivo), se observó una inhibición de la captación de hierro por calcio después de la adición de FAS $10 \mu\text{M}$, como se muestra en la [Figura 2.1](#). Por tanto, se concluye que el calcio extracelular actúa como inhibidor de la captación de hierro por las células Caco-2, de forma reversible.

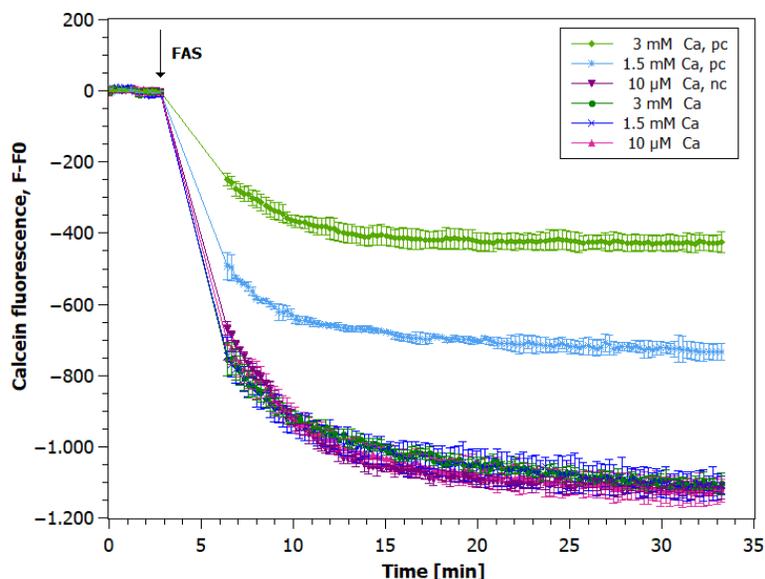


Figura 2.3. El calcio es un inhibidor reversible de la captación de hierro. Las células Caco-2 se preincubaron durante 10 minutos con $10 \mu\text{M}$ (morado claro \blacktriangle), $1,5 \text{ mM}$ (azul \times) o 3 mM (verde oscuro \bullet) de Ca^{2+} , y luego se lavaron con PBS (x2) y se incubaron en un medio con $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 durante 10 minutos antes de comenzar la medición de fluorescencia de referencia durante 3 minutos, seguido de la adición de $10 \mu\text{M}$ de FAS. Se incluyeron experimentos de control positivo y negativo. En el control positivo (pc), las células se incubaron con $1,5 \text{ mM}$ (azul claro $*$) o 3 mM (verde \blacklozenge) de CaCl_2 , y en el control negativo (nc) con $10 \mu\text{M}$ CaCl_2^+ (morado \blacktriangledown). Los resultados experimentales se presentan como *media* \pm *D.E.* de 4 pocillos, y para cada control se presentan como *media* \pm *D.E.* de 2 pocillos. Las mediciones de fluorescencia se obtuvieron en un lector de placas Synergy 2 (BioTek®).

2.3.4 Modelamiento matemático del efecto inhibitor del calcio a través del decaimiento de la fluorescencia de la calceína

Dadas las condiciones en las que se llevaron a cabo todos los experimentos de este trabajo, DMT1 es el único componente de transporte de hierro relevante que permanece en la membrana celular y puede interactuar con el hierro ([Colins y col., 2017](#)). La actividad de la reductasa férrica DcytB puede despreciarse ya que el hierro se encuentra en su forma ferrosa en el medio apical y, por lo tanto, no se requiere la reducción del hierro férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}).

Todos los experimentos se realizaron en medios libres de suero. Por lo tanto, el contenido de transferrina en el medio extracelular se redujo al mínimo y su actividad también puede despreciarse ([Huebers y col., 1987](#)). Además, dada la escala de tiempo experimental, la actividad de Ferroportina 1 (FPN) se considera no significativa ([Núñez y col., 2010](#)), y la dinámica del sistema observada puede considerarse no afectada por los mecanismos de regulación sistémica, transcripcional y traduccional ([Cegarra y col., 2019](#)). Para desacoplar el transporte de Fe^{2+} mediado por DMT1 de la concentración de protones, el pH del medio apical y basolateral se fijó en 7 para todos los experimentos ([Colins y col., 2017](#)).

Una investigación previa desarrollada en ovocitos de *Xenopus* muestra que los metales alcalinotérreos que no son transportados por DMT1, como Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , y Ca^{2+} , pueden actuar como inhibidores no competitivos de este transportador (Shawki y Mackenzie, 2010). Se propone un mecanismo de inhibición no competitiva del calcio para la captación y transporte de hierro a través de DMT1, donde Ca^{2+} se une a un sitio alostérico no catalítico de DMT1. Para representar este efecto inhibitorio, se utilizó el modelo cinético básico para la inhibición no competitiva (Voet y Voet, 2010; Blat, 2010; Bhagavan y Ha, 2015), derivado del diagrama que se muestra en la Figura 2.4.

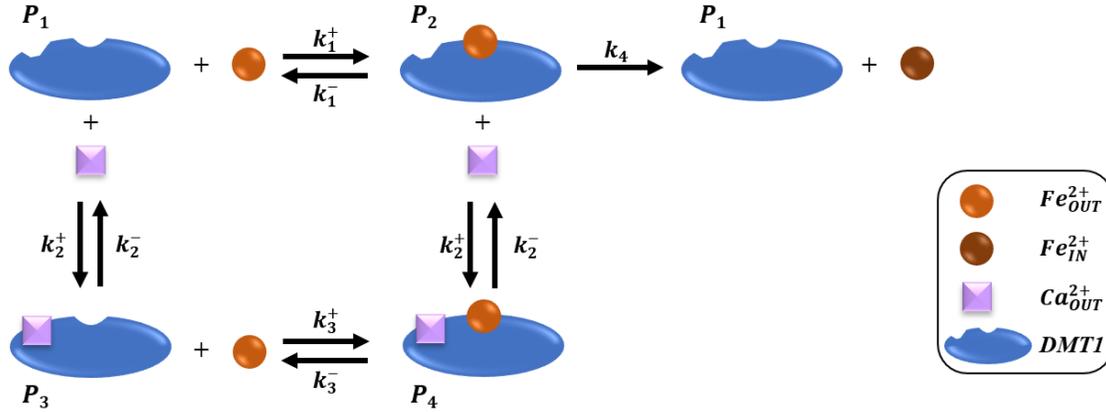


Figura 2.4. Modelo propuesto para la inhibición reversible no competitiva de DMT1 por calcio. El calcio se une al complejo DMT1 y DMT1-Fe. El complejo DMT1-Fe-Ca no puede transportar hierro al interior de la célula. DMT1 vacío (P_1) puede unirse a Fe_{OUT}^{2+} ($P_1 \rightarrow P_2$) y luego a Ca_{OUT}^{2+} ($P_2 \rightarrow P_4$), o puede unirse a Ca_{OUT}^{2+} ($P_1 \rightarrow P_3$) y luego a Fe_{OUT}^{2+} ($P_3 \rightarrow P_4$). DMT1 unido solo a Fe_{OUT}^{2+} (P_2) libera hierro al medio intracelular y vuelve a su estado original ($P_2 \rightarrow P_1$). (Círculo naranja): concentración de hierro extracelular (Fe_{OUT}^{2+}); (círculo marrón): concentración de hierro en el espacio intracelular (Fe_{IN}^{2+}); (cuadrado morado): concentración de calcio extracelular (Ca_{OUT}^{2+}); (óvalo azul): DMT1.

P_1 corresponde a DMT1 en su estado vacío, P_2 a DMT1 unida a Fe_{OUT}^{2+} , P_3 a DMT1 unida a Ca_{OUT}^{2+} , y P_4 a DMT1 unida a Fe_{OUT}^{2+} y Ca_{OUT}^{2+} . En este modelo, Fe_{OUT}^{2+} se une de forma reversible a DMT1 libre ($P_1 \rightarrow P_2$) o al complejo DMT1- Ca_{OUT}^{2+} ($P_3 \rightarrow P_4$), y Ca_{OUT}^{2+} se une reversiblemente a DMT1 libre ($P_1 \rightarrow P_3$) o al complejo DMT1- Fe_{OUT}^{2+} ($P_2 \rightarrow P_4$). El complejo DMT1- Fe_{OUT}^{2+} - Ca_{OUT}^{2+} es catalíticamente inactivo. El hierro se solvata solo del complejo DMT1- Fe_{OUT}^{2+} y deja el sitio de unión de DMT1 para convertirse en parte de la ferritina o del cLIP, y DMT1 vuelve a su estado vacío inicial ($P_2 \rightarrow P_1$). Se asume que ambos pasos de unión a Ca_{OUT}^{2+} tienen las mismas constantes de disociación, lo que representa la misma afinidad por el calcio tanto para DMT1 como para el complejo DMT1- Fe_{OUT}^{2+} .

Se obtuvo un modelo matemático que comprende las ecuaciones diferenciales derivadas de los balances de masa para todas las especies de la Figura 2.4, bajo el supuesto de que todas las reacciones en el mecanismo son elementales:

$$\frac{dP_1}{dt} = -k_1^+ \cdot P_1 \cdot Fe_{OUT}^{2+} - k_2^+ \cdot P_1 \cdot Ca_{OUT}^{2+} + k_1^- \cdot P_2 + k_4 \cdot P_2 + k_2^- \cdot P_3 \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

$$\frac{dP_2}{dt} = -k_1^- \cdot P_2 - k_4 \cdot P_2 - k_2^+ \cdot P_2 \cdot Ca_{OUT}^{2+} + k_1^+ \cdot P_1 \cdot Fe_{OUT}^{2+} + k_2^- \cdot P_4 \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

$$\frac{dP_3}{dt} = -k_2^- \cdot P_3 - k_3^+ \cdot P_3 \cdot Fe_{OUT}^{2+} + k_2^+ \cdot P_1 \cdot Ca_{OUT}^{2+} + k_3^- \cdot P_4 \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

$$\frac{dP_4}{dt} = -k_2^- \cdot P_4 - k_3^- \cdot P_4 + k_2^+ \cdot P_2 \cdot Ca_{OUT}^{2+} + k_3^+ \cdot P_3 \cdot Fe_{OUT}^{2+} \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

$$\frac{dFe_{cLIP}^{2+}}{dt} = DMT1_{Eff} \cdot k_4 \cdot P_2 \quad (\text{Ecuación 2.7})$$

$$\frac{dFe_{OUT}^{2+}}{dt} = \frac{-V_{IN}}{V_{OUT}} \cdot \frac{dFe_{cLIP}^{2+}}{dt} \quad (\text{Ecuación 2.8})$$

$$\frac{dF_{Calcein}}{dt} = -F_F \cdot \frac{dFe_{cLIP}^{2+}}{dt} \quad (\text{Ecuación 2.9})$$

En las [Ecuaciones 2.3 a 2.9](#), la concentración de hierro en el espacio citosólico y la concentración de hierro apical se denotan por Fe_{cLIP}^{2+} y Fe_{OUT}^{2+} , respectivamente. La fluorescencia de la calceína se denota por $F_{Calcein}$. Ca_{OUT}^{2+} es la concentración apical de calcio. P_i corresponde a la fracción de DMT1 en estado i . k_j^+ y k_j^- son las constantes de velocidad directa e inversa, respectivamente. [Ecuaciones 2.3 a 2.6](#) se obtienen directamente aplicando la ley de acción de masas para todas las transiciones que involucran estos estados.

La [Ecuación 2.7](#) representa la captación de hierro en el espacio citosólico resultante del transporte directo por DMT1 en la transición $P_2 \rightarrow P_1$. La [Ecuación 2.8](#) se obtiene aplicando la conservación de la masa. La [Ecuación 2.9](#) representa la extinción de la fluorescencia de la calceína debido a la entrada de hierro en el cLIP. F_F es un factor de conversión que representa la equivalencia entre la concentración de hierro en el cLIP y la fluorescencia de calceína, y forma parte de los parámetros del modelo establecidos junto con k_j^+ , k_j^- y $DMT1_{Eff}$.

El modelo propuesto no considera explícitamente la cantidad de DMT1 ya que este valor no ha sido reportado en una célula Caco-2 promedio, pero se supone que es constante para la escala de tiempo experimental ([Núñez, 2010](#)). $DMT1_{Eff}$ es la concentración efectiva total de transportadores disponibles para el transporte de hierro y corresponde a $[DMT1_{Eff}] = DMT1/\varphi$, donde $DMT1$ es la cantidad total del transportador y φ es la efectividad del ciclo de transporte del modelo.

$V_{OUT} = 200 \mu L$ es el volumen del medio apical. $V_{IN} = 5,92 \mu L$ es el volumen de la monocapa celular que se calculó como $V_{IN} = \pi \cdot r_{well}^2 \cdot h_c$, donde $h_c = 29,6 \mu m$ es la altura de Caco-2 ([Hidalgo y col., 1989](#)), y se supone constante para la escala de tiempo experimental. $r_{well} = 0,7979 cm$ es el radio del pocillo de cultivo considerando el área de crecimiento de cada pocillo de la placa de 24 pocillos como $2 cm^2$ ([Freshney, 2015](#)).

Dado que la detección de la captación de hierro se realiza mediante la medición de la extinción de la fluorescencia de la calceína, las constantes cinéticas del modelo se ajustaron mediante el conjunto de entrenamiento. La técnica de validación cruzada dejando uno fuera (LOOCV) o Jackknife es el método de remuestreo más utilizado para ajustar los parámetros del modelo cuando la cantidad de datos disponibles es limitada, lo que ayuda a evitar el sobreajuste ([Nanni y Lumini, 2008](#); [Priddy y Keller, 2005](#); [Rao y col., 2008](#)), y se utilizó para ajustar los parámetros del modelo ([Colins y col., 2017](#); [Cegarra y col., 2019](#)).

Los parámetros del modelo se ajustan al conjunto de datos de entrenamiento experimental al minimizar el error cuadrático medio (MSE) entre el elemento omitido y el valor predicho usando el modelo, con el algoritmo simplex de Nelder-Mead, repitiendo el proceso de ajuste de parámetros un número de veces igual al número de observaciones

experimentales N (Lagarias y col., 1998). Al final del proceso iterativo, se obtiene una estimación del error de generalización, dado por el error cuadrático medio de Jackknife (MSE_{JK}), que se define como la suma de las diferencias entre el valor experimental eliminado (Y_i) en cada iteración i y el valor predicho por el modelo (\hat{Y}_i). En este trabajo:

$$MSE_{JK} = \sum_{i=1}^N |\hat{Y}_i - Y_i| \quad (\text{Ecuación 2.10})$$

donde $N = 2196$ ($N = 12 \cdot 61 = 732$ para cada concentración de Ca^{2+} , con o sin BAPTA-AM), Y_i es el valor experimental de la fluorescencia de calceína, y \hat{Y}_i es la fluorescencia de calceína predicha por el modelo. Una descripción detallada de la aplicación del método Jackknife se presenta en (Colins y col., 2017).

La estimación inicial del algoritmo de optimización asociado al proceso de ajuste de parámetros se obtuvo a partir de un estudio preliminar del comportamiento del modelo cualitativo. Para las concentraciones de hierro y la fluorescencia de calceína, las condiciones iniciales se establecieron como $Fe_{CLIP}^{2+}(0) = 0 \mu\text{M}$, $Fe_{OUT}^{2+}(0) = 10 \mu\text{M}$, $F_{Calcein}(0) = 0$. Las condiciones iniciales de las fracciones de DMT1 se establecieron considerando que los experimentos se realizan en medios libres de suero y con la mínima concentración extracelular de calcio y se supuso que eran $P_1(0) = 0,98$, $P_2(0) = 0,01$, $P_3(0) = 0,005$, $P_4(0) = 0,005$. Todos los cálculos y simulaciones se realizaron con un integrador comercial que utiliza los métodos de integración numérica de la familia Runge-Kutta (Shampine, 1986).

Para ajustar los parámetros del modelo descritos por las Ecuaciones 2.3 a 2.9 (k_1^+ , k_1^- , k_2^+ , k_2^- , k_3^+ , k_3^- , k_4 , $DMT1_{Eff}$, F_F), se utilizaron como conjunto de entrenamiento las mediciones de fluorescencia de calceína tomadas cada 33,6 segundos (Figura 2.1A), y se utilizaron como conjunto de datos de prueba las mediciones de fluorescencia de calceína tomadas cada 25,3 segundos (Figura 2.1B).

Usando los datos experimentales del conjunto de entrenamiento, se ajustó cada uno de los parámetros del modelo a un valor constante que permitiría que el modelo representara la dinámica de la extinción de la fluorescencia de la calceína para cada concentración de calcio utilizada. Sin embargo, el modelo no captura la dinámica del sistema para $10 \mu\text{M}$ o 3 mM de Ca^{2+} y solo puede capturarla cualitativamente cuando la concentración de calcio extracelular es $1,5 \text{ mM Ca}^{2+}$.

Después de aplicar la técnica de Jackknife para ajustar los parámetros del modelo de manera global, se encontró que los valores obtenidos para cada parámetro son cercanos, excepto los valores de k_2^+ y $[DMT1_{Eff}]$, que varían significativamente para cada concentración de calcio extracelular. Así, se ajustaron los parámetros k_2^+ y $[DMT1_{Eff}]$ para cada concentración de calcio utilizada de forma independiente, manteniendo los valores encontrados en el primer ajuste para el resto de parámetros. Los valores de los parámetros así obtenidos se muestran en la Tabla 2.2.

Los intervalos de confianza obtenidos para los parámetros del modelo (Tabla 2.2) son estrechos, y cada parámetro se identifica como significativo a niveles de confianza del 95 % ya que todos los valores de p (p -values) obtenidos son inferiores a 0,05 (prueba t de Student). El coeficiente de determinación (R^2) calculado entre el modelo y los datos experimentales para cada concentración de calcio utilizada se muestra en la Tabla 2.2. Los altos valores de R^2 obtenidos indican que el modelo explica un alto porcentaje de la varianza experimental de los datos considerados.

El parámetro $[DMT1_{Eff}]$ disminuye y k_2^+ aumenta a medida que aumenta la concentración de calcio, lo que da como resultado una disminución del transporte de hierro mediado por DMT1 hacia el cLIP.

En el entorno experimental, las células se incubaron con $10 \mu M$, $1,5 mM$ o $3 mM$ de Ca^{2+} durante aproximadamente 5 minutos antes de la adición de FAS. Se considera la misma condición inicial para el modelo en todos los casos. Las concentraciones más altas de calcio extracelular tienen el efecto de aumentar la constante de la tasa de unión al calcio k_2^+ , lo que permite que el modelo capture rápidamente el aumento en la fracción de DMT1 unida a Ca_{OUT}^{2+} (catalíticamente inactiva).

Se usó una expresión de tipo Monod para representar la dependencia de k_2^+ con el calcio, que puede describirse de manera efectiva usando una curva de saturación. Los coeficientes de la ecuación de tipo Monod son k_{2MAX}^+ y K_S , donde k_{2MAX}^+ ($[min \cdot \mu M]^{-1}$) es la tasa máxima de unión al calcio y K_S (μM) es la constante de velocidad media. Ajustando estas constantes para obtener los valores de k_2^+ que se muestran en la [Tabla 2.2](#), se obtuvo la [Ecuación 2.11](#).

$$k_2^+ = \frac{k_{2MAX}^+ \cdot [Ca^{2+}]}{K_S + [Ca^{2+}]} = \frac{2,0261 \cdot 10^{-3} \cdot [Ca^{2+}]}{1,3399 \cdot 10^3 + [Ca^{2+}]} \quad (\text{Ecuación 2.11})$$

Por otra parte, el aumento de la concentración de calcio extracelular implica un aumento de la eficacia del ciclo de transporte del hierro φ , ya que aumenta la proporción de transportadores catalíticamente inactivos. Por tanto, la concentración de transportadores efectivos disponibles para el transporte de hierro ($[DMT1_{Eff}] = DMT1/\varphi$) disminuye como consecuencia del aumento de la concentración de calcio utilizada. La concentración efectiva de DMT1, $DMT1_{Eff}$, es inversamente proporcional a la concentración de calcio, por lo que la efectividad del ciclo de transporte de hierro φ puede describirse con una relación lineal dependiente de la concentración de calcio del tipo $\varphi = \beta + [Ca^{2+}]$. La concentración de transportadores efectivos disponibles para el transporte de hierro será entonces:

$$[DMT1_{Eff}] = \frac{DMT1}{\beta + [Ca^{2+}]} \quad (\text{Ecuación 2.12})$$

La [Ecuación 2.13](#) se obtuvo luego de ajustar las constantes $DMT1$ y β de la [Ecuación 2.12](#) para obtener los valores de $[DMT1_{Eff}]$ que se muestran en la [Tabla 2.2](#).

$$[DMT1_{Eff}] = \frac{8,1549 \cdot 10^3}{5,9190 \cdot 10^3 + [Ca^{2+}]} \quad (\text{Ecuación 2.13})$$

Los parámetros asociados a la constante de Michaelis (k_4 , k_1^- y k_1^+) se obtuvieron en la primera ronda de ajuste y por lo tanto mantienen el mismo valor para cada concentración de calcio utilizada. Esto refuerza la idea de que el Ca^{2+} actúa como un inhibidor no competitivo de la captación de hierro mediada por DMT1. El valor de la constante de Michaelis ($K_M = (k_4 + k_1^-)/k_1^+$), permanece igual a $9,8663 \cdot 10^4 \mu M$ en todos los casos.

[Linder y col. \(2006\)](#) determinaron que la absorción de hierro por DMT1 era un proceso saturable, que podía caracterizarse por una constante de Michaelis (K_M) cercana a $7 \pm 1 \mu M$, cuando las células Caco-2 se desafiaron con $^{59}Fe^{2+}$ en presencia de ascorbato a pH 7. Por otro lado, [Thumser y col. \(2010\)](#) informaron un $K_M \approx 13,2 \pm 1,6 \mu M$ para la

captación de ^{55}Fe en las células Caco-2 en ausencia de ascorbato. La constante de Michaelis para DMT1 obtenida en este estudio a partir de los parámetros ajustados utilizando los valores del decaimiento de la fluorescencia de la calceína, no se puede comparar con los valores informados anteriormente, que se calcularon a partir de las concentraciones de hierro intracelular. Hasta el momento no se ha reportado ningún factor de conversión que permita calcular la equivalencia entre la concentración de hierro en el cLIP y la fluorescencia de calceína. Si bien el modelo propuesto es capaz de capturar la dinámica del transporte de hierro y el efecto del Ca^{2+} , no necesariamente considera todos los elementos del mecanismo involucrado en la inhibición de DMT1 por el calcio. Como resultado, algunos de los parámetros calculados podrían estar asociados con otros componentes del sistema experimental no representados explícitamente en el modelo.

Tabla 2.2. Parámetros del modelo de inhibición reversible no competitiva de DMT1 por calcio.

Parámetro	Valor	Unidad	Intervalos de confianza ($\alpha=0,05$)	p-value
k_1^+	$5,459 \cdot 10^{-6}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$	$\pm 4,2482 \cdot 10^{-7}$ * $\pm 1,9462 \cdot 10^{-7}$ † $\pm 2,1043 \cdot 10^{-7}$ §	0,0219 * 0,0232 † 0,0321 §
k_1^-	$8,960 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}	$\pm 4,0115 \cdot 10^{-5}$ * $\pm 7,9812 \cdot 10^{-4}$ † $\pm 2,7410 \cdot 10^{-3}$ §	0,0277 * 0,0262 † 0,0307 §
k_2^+	$0,006 \cdot 10^{-3}$ * $1,071 \cdot 10^{-3}$ † $1,450 \cdot 10^{-3}$ §	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$	$\pm 7,8739 \cdot 10^{-5}$ * $\pm 4,6604 \cdot 10^{-5}$ † $\pm 8,5202 \cdot 10^{-5}$ §	0,0177 * 0,0208 † 0,0288 §
k_2^-	3,8485	min^{-1}	$\pm 0,1687$ * $\pm 0,2324$ † $\pm 0,0731$ §	0,0230 * 0,0211 † 0,0274 §
k_3^+	$3,890 \cdot 10^{-7}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$	$\pm 5,5969 \cdot 10^{-8}$ * $\pm 3,5737 \cdot 10^{-8}$ † $\pm 6,7751 \cdot 10^{-9}$ §	0,0225 * 0,0114 † 0,0273 §
k_3^-	$7,80 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}	$\pm 6,8562 \cdot 10^{-5}$ * $\pm 4,6849 \cdot 10^{-5}$ † $\pm 2,4437 \cdot 10^{-5}$ §	0,0236 * 0,0136 † 0,0275 §
k_4	0,449	min^{-1}	$\pm 0,0182$ * $\pm 0,0098$ † $\pm 0,0075$ §	0,0241 * 0,0244 † 0,0316 §
$DMT1_{Eff}$	138,543 * 108,134 † 92,433 §	μM	$\pm 4,9404$ * $\pm 7,5648$ † $\pm 5,9177$ §	0,0269 * 0,0287 † 0,0271 §
F_F	2,991	$UF \cdot [\text{pM}]^{-1}$ ‡	$\pm 0,2057$ * $\pm 0,1840$ † $\pm 0,2269$ §	0,0207 * 0,0156 † 0,0145 §

*: $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$,

†: $1,5 \text{ mM Ca}^{2+}$,

§: $3,0 \text{ mM Ca}^{2+}$

‡ UF: unidad de fluorescencia

Para el conjunto de entrenamiento: $R^2 = 0,9884$, $MSE_{jk} = 0,5382$ para $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$;
 $R^2 = 0,9916$, $MSE_{jk} = 0,3092$ para $1,5 \text{ mM Ca}^{2+}$;
 $R^2 = 0,9922$, $MSE_{jk} = 0,2685$ para $3,0 \text{ mM Ca}^{2+}$.

Para el conjunto de prueba: $R^2 = 0,9924$, $MSE_{jk} = 0,3809$ para $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$;
 $R^2 = 0,9908$, $MSE_{jk} = 0,4008$ para $1,5 \text{ mM Ca}^{2+}$;
 $R^2 = 0,9804$, $MSE_{jk} = 0,9079$ para $3,0 \text{ mM Ca}^{2+}$.

En la [Figura 2.5](#) se muestra la simulación del modelo para la inhibición reversible no competitiva de DMT1 por calcio, para el decaimiento de la fluorescencia de calceína después de un desafío con hierro. Estas simulaciones se realizaron usando los parámetros de la [Tabla 2.2](#), que se determinaron usando solo el conjunto de entrenamiento experimental. Los resultados de la simulación confirman la capacidad del modelo para predecir el comportamiento de la extinción de la fluorescencia de la calceína observado experimentalmente para los conjuntos de datos de entrenamiento ([Figura 2.5A](#)) y prueba ([Figura 2.5B](#)), lo que respalda la viabilidad de la estructura propuesta.

El modelo propuesto en este estudio permite simular la reducción del decaimiento de la fluorescencia de la calceína que se observa cuando las células se exponen a una mayor concentración de calcio extracelular. Las simulaciones de modelos y las observaciones experimentales confirman que el calcio actúa como un inhibidor no competitivo de la captación de hierro mediada por DMT1. Por lo tanto, este modelo representa efectivamente el efecto inhibitor del calcio en la entrada de hierro en el cLIP de las células Caco-2 mediada por DMT1.

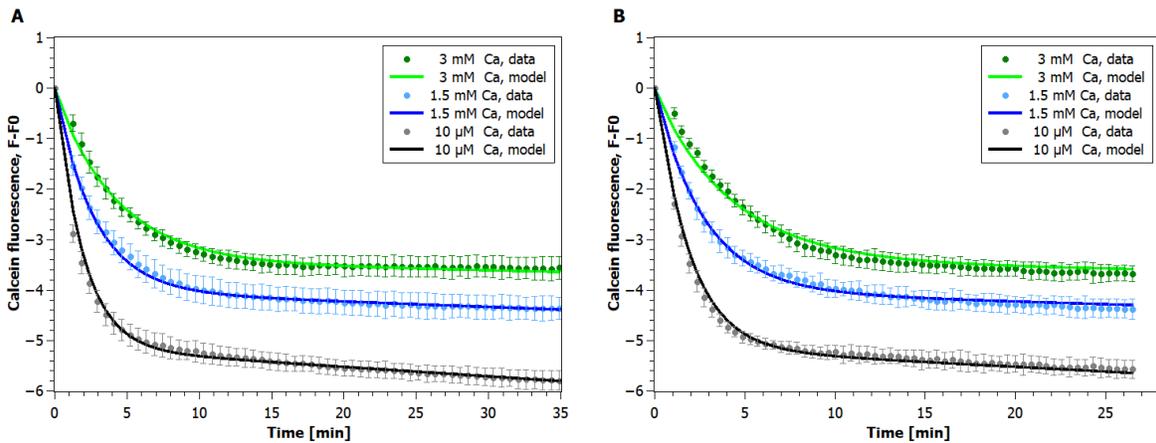


Figura 2.5. Simulación de la inhibición reversible no competitiva de DMT1 por calcio, después la adición de $10 \mu\text{M}$ de FAS, cuando la concentración de calcio extracelular era $10 \mu\text{M}$, $1,5 \text{ mM}$ o 3 mM de Ca^{2+} . (●): media de las observaciones experimentales, con y sin BAPTA-AM; (—): simulación de modelo. (A) Decaimiento de la fluorescencia de la calceína para el conjunto de entrenamiento. Los resultados experimentales se presentan como *media* \pm *D.E.* de 24 pocillos. (B) Decaimiento de la fluorescencia de la calceína para el conjunto de prueba. Los resultados experimentales se presentan como *media* \pm *D.E.* de 16 pocillos.

La distribución prevista de DMT1 para cada concentración de calcio estudiada se muestra en la [Figura 2.6](#). Al comienzo de la simulación, el estado P_2 (DMT1 unida a $\text{Fe}_{\text{OUT}}^{2+}$) no aumenta para $1,5 \text{ mM}$ o 3 mM de Ca^{2+} , lo que implica una menor entrada de hierro en el cLIP inmediatamente después del desafío del hierro. Por otro lado, la cantidad de DMT1 en el estado P_3 (DMT1 unida a $\text{Ca}_{\text{OUT}}^{2+}$) aumenta a medida que aumenta la concentración de calcio, y los estados P_2 y P_4 tardan más en alcanzar un estado estacionario. Además, el estado P_4 aumenta al comienzo de la simulación solo para 3 mM de Ca^{2+} , lo que lleva a un aumento en la fracción de DMT1 que es catalíticamente inactiva (el complejo $\text{DMT1-Fe}_{\text{OUT}}^{2+}\text{-Ca}_{\text{OUT}}^{2+}$). Sólo para $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} , la cantidad de DMT1 en su estado libre (P_1) aumenta porque la concentración de calcio es muy baja. Por lo tanto, el

modelo captura con precisión la reducción en la tasa de extinción de la fluorescencia de calceína que ocurre cuando aumenta la concentración de calcio extracelular.

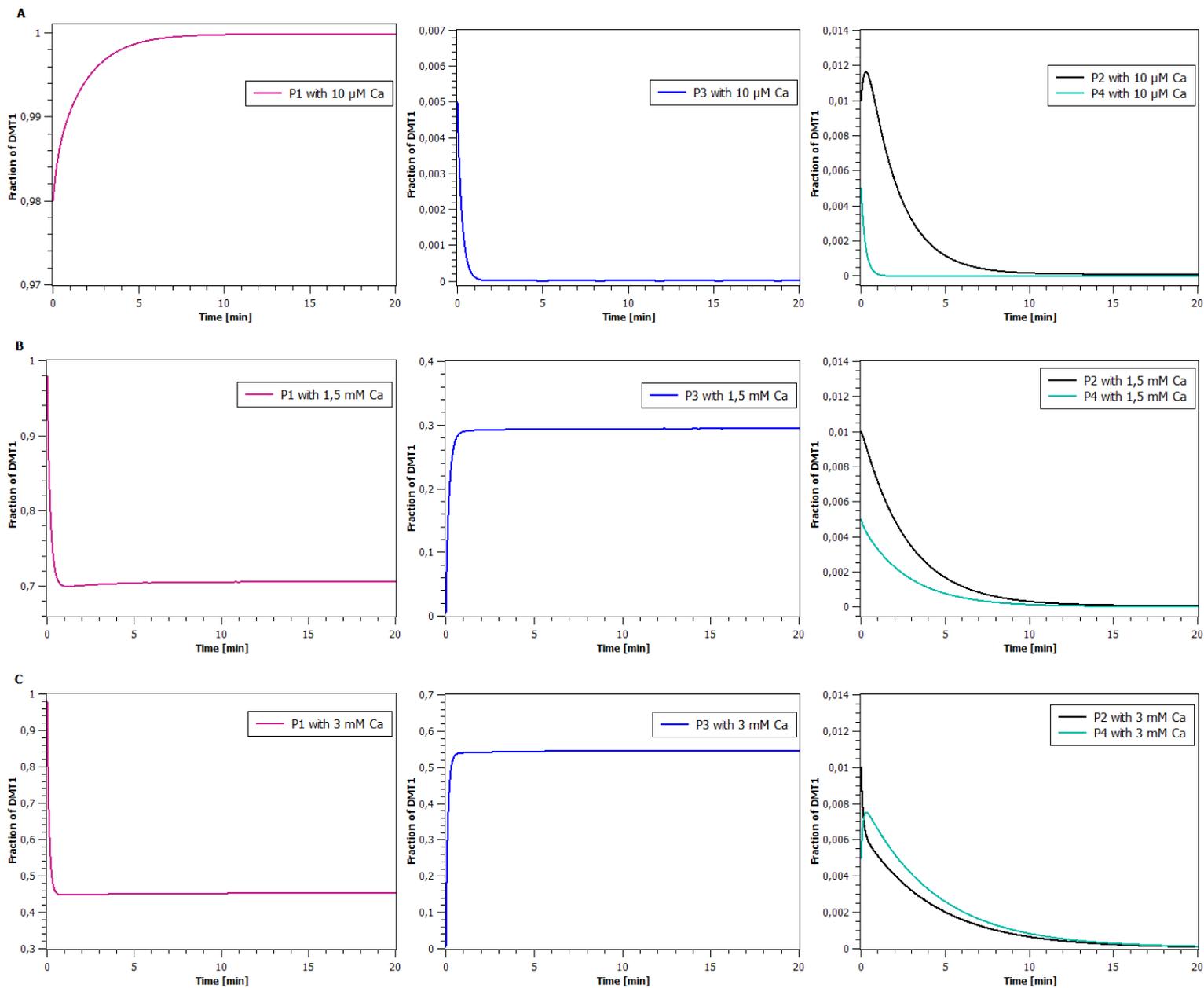


Figura 2.6. Simulación de los estados de DMT1 durante la captación de hierro para cada concentración de calcio extracelular estudiada. Fracciones de DMT1 con (A) 10 μM , (B) 1,5 mM, o (C) 3 mM de Ca^{2+} .

2.4 Conclusión

El objetivo principal del presente capítulo fue analizar el efecto del calcio extracelular e intracelular sobre la incorporación de hierro en el cLIP de las células Caco-2 y proporcionar una estructura matemática mecanicista para analizar los resultados experimentales obtenidos. La variación en el cLIP se usó como un indicador indirecto de la captación de hierro celular después de que las células se desafiaron con hierro ($10 \mu M$ de FAS).

Se observó que la incorporación de hierro en el cLIP disminuyó a medida que aumentaba la concentración de calcio extracelular. Dado que el aumento de la concentración de calcio extracelular podría aumentar el calcio en el espacio intracelular inmediato a la membrana plasmática, se probó el efecto putativo de los niveles de calcio intracelular en la captación de hierro. La quelación del calcio intracelular con BAPTA no tuvo ningún efecto sobre la incorporación de hierro en el cLIP, ya que la diferencia en la extinción de la fluorescencia de la calceína en presencia de un desafío con hierro no fue significativa, ya sea que las células hayan sido pretratadas o no con BAPTA-AM. Esta observación apoya la idea de que el efecto inhibitorio del calcio sobre la captación de hierro no se ejerce a través de la señalización del Ca^{2+} intracelular, sino que es un efecto verdaderamente extracelular. Estos resultados están de acuerdo con los resultados informados por [Shawki y Mackenzie \(2010\)](#), quienes midieron las corrientes provocadas por Fe^{2+} en ovocitos de *Xenopus* que expresan DMT1 humano y encontraron que el efecto inhibitorio del Ca^{2+} sobre el transporte de hierro persiste después de quelar el Ca^{2+} intracelular, ya que la magnitud de estas corrientes no se vio afectada.

El hierro no hemo en su forma Fe^{2+} se transporta a las células Caco-2 principal o únicamente a través de DMT1 ([Mackenzie y col., 2005](#); [Dasa y Abera, 2018](#); [Yu y col., 2019](#)). Considerando esto, nuestros resultados proporcionan evidencia adicional de que el calcio actúa como un inhibidor no competitivo de DMT1.

Para estudiar si el calcio ejerce una inhibición reversible de la captación de hierro, las células Caco-2 se lavaron después de preincubarlas durante 10 minutos con $10 \mu M$, $1,5 mM$ o $3 mM$ de Ca^{2+} , y, posteriormente, se incubaron durante 10 minutos con $10 \mu M$ de Ca^{2+} antes de comenzar la lectura de fluorescencia de calceína. No se observaron diferencias significativas en el decaimiento de la fluorescencia de calceína cuando se realizó un paso de lavado después de incubar las células Caco-2 con $1,5 mM$ o $3 mM$ de Ca^{2+} en comparación con las mediciones de fluorescencia de calceína obtenidas para las células que se preincubaron con $10 \mu M$ de Ca^{2+} ([Figura 2.3](#)). Por lo tanto, el efecto inhibitorio del calcio sobre la captación de hierro no se observó cuando el calcio se eliminó después de la preincubar las células con altas concentraciones de calcio. Estos resultados indican que el calcio actúa como un inhibidor reversible.

Se ha informado que los residuos del sitio de unión al sustrato de DMT1 coordinan la unión con Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} entre otros metales de transición divalentes, pero no Ca^{2+} o Mg^{2+} ([Ehrnstorfer y col., 2014](#); [Manatschal y col., 2019](#)). Por esta razón, DMT1 cataliza el cotransporte de protones y de iones de metales de transición divalentes como el Fe^{2+} , mientras que los iones de metales alcalinotérreos como el Ca^{2+} no son transportados ([Shawki y Mackenzie, 2010](#)). Por otro lado, estudios previos informan una mutación única de DMT1 en humanos, ratones microcíticos y ratas de Belgrado, que consiste en la sustitución de un residuo de glicina conservado en el lado extracelular de la hélice α -4 a arginina ([Ehrnstorfer y col., 2014](#)), lo que afecta severamente la capacidad de transporte de

hierro de DMT1, lo cual provoca anemia en estas especies, y además se asocia con un aumento permeabilidad al calcio del DMT1 mutante (Xu y col., 2004). Considerando la información previa y la evidencia reportada en esta investigación, se puede postular que el Ca^{2+} se une a un sitio alostérico no catalítico de DMT1. En consecuencia, el modelo propuesto se basó en el esquema cinético de una inhibición reversible no competitiva.

Las predicciones obtenidas con el modelo concuerdan bien con los datos experimentales que se muestran en la Figura 2.5A, incluso con el conjunto de datos de prueba que no se usó para el ajuste de parámetros (Figura 2.5B). Los resultados de la simulación en la Figura 2.5 muestran la capacidad del modelo para representar la disminución en la entrada de hierro en el cLIP cuando las células se exponen a concentraciones de calcio extracelular más altas, tanto cualitativa como cuantitativamente. Por lo tanto, este modelo, que considera una descripción de los estados de DMT1, describe con precisión el decaimiento de la fluorescencia de la calceína observada experimentalmente cuando las células se exponen a diferentes concentraciones de calcio extracelular tras un desafío con hierro. Las simulaciones del modelo y las observaciones experimentales confirmaron el efecto inhibitorio del calcio extracelular sobre la entrada de hierro mediada por DMT1 en el cLIP de las células Caco-2.

La ingesta dietética recomendada por el Instituto de Medicina de EE.UU. de hierro (18 mg/día) (Institute of Medicine (US), 2001) y calcio (1000 mg/día) (Institute of Medicine (US), 2011), equivalen en el sistema experimental a 10 μM de FAS y 1,5 mM de CaCl_2 . Con base en los resultados presentados aquí, es posible especular que, si se toman juntos, el suplemento de calcio podría afectar negativamente la captación intestinal de hierro. Por lo tanto, debería ser recomendable que estos dos suplementos pudieran tomarse en diferentes momentos. De manera similar, considerando que la leche de vaca contiene aproximadamente 450 mg de calcio elemental por porción de 355 mL (Chon y col., 2018), las concentraciones de calcio en el intestino podrían llegar a 30 mM. Incluso permitiendo una dilución considerable (hasta 20 veces) durante el tránsito estomacal, la concentración de calcio resultante debería inhibir la absorción intestinal de hierro en la dieta.

En resumen, se encontró que la presencia de Ca^{2+} extracelular, en concentraciones típicamente utilizadas en el medio de cultivo celular o encontradas en el intestino después de la ingesta de suplementos de calcio o leche, conduce a una reducción significativa en la captación de hierro por parte de las células intestinales. También se encontró que el Ca^{2+} extracelular, pero no intracelular, ejerce una inhibición reversible no competitiva de la captación de hierro. Finalmente, se propuso un modelo basado en una descripción de los estados de DMT1 que representan efectivamente la entrada de hierro en el grupo de hierro lábil citosólico (cLIP) observado experimentalmente, rastreado por el decaimiento de la fluorescencia de calceína. Se necesitarán más esfuerzos para identificar el supuesto sitio inhibitorio del calcio en DMT1 que media la inhibición del calcio de la absorción de hierro.

Capítulo 3: Caracterización experimental de la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN en las células Caco-2, inducida por la presencia o ausencia en el medio extracelular de hierro no hemo y/o calcio

Resumen

El calcio es uno de los elementos más importantes para el humano y su ingesta adecuada puede aumentar la densidad ósea en los niños y prevenir la osteoporosis en personas de mediana edad. Sin embargo, se ha mostrado a través de estudios que utilizan la extinción de la fluorescencia de la calceína, que el calcio inhibe la captación de hierro en las células Caco-2 de una manera dependiente de la concentración, lo que causa gran preocupación considerando que la deficiencia de hierro y la anemia por deficiencia de hierro siguen siendo un importante problema de salud pública a nivel mundial. La absorción intestinal de hierro comprende la actividad coordinada de los transportadores DMT1 y FPN. En este capítulo se utilizan células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales como modelo de epitelio intestinal, para estudiar a través de microscopía confocal el movimiento de DMT1-EGFP y FPN-TagRFP entre compartimentos celulares en función del suministro de hierro en presencia de diferentes concentraciones de calcio, luego de que las células se sometieran a una privación de hierro. El calcio extracelular modificó la ubicación de DMT1, ya que mientras mayor fue la concentración de calcio a la cual se expusieron las células, mayor fue la reubicación de DMT1 en los dominios basales; en cambio, al reducir al mínimo la concentración de calcio, la concentración apical de DMT1 aumentó significativamente. Además, se encontró que los cambios en la localización de FPN inducidos por las concentraciones de calcio extracelular no fueron significativos. Cuando las células se expusieron a hierro, se indujo una relocalización de DMT1 a los compartimentos intracelulares, pero esta relocalización fue más rápida cuando la concentración de Ca^{2+} extracelular era de $10 \mu\text{M}$ en comparación con la obtenida en presencia de 3 mM . Los resultados mostrados indican por primera vez que el ciclo endocítico del transportador DMT1 en las células Caco-2 polarizadas está determinado no sólo por la presencia de hierro en el compartimiento apical, sino también por la concentración de calcio en ese compartimiento. Los hallazgos obtenidos al realizar el seguimiento de la fluorescencia verde de DMT1 y roja de FPN con microscopía confocal sugieren que el calcio inhibe de manera no competitiva la captación de hierro mediada por DMT1 en células Caco-2. Las diferentes dinámicas de relocalización de DMT1 observadas en función de las concentraciones de Ca^{2+} y de Fe^{2+} en el compartimiento apical de las células Caco-2 polarizadas cultivadas en insertos, dejan en evidencia que efectivamente el efecto inhibitorio del calcio sobre la captación de hierro se ejerce sobre DMT1, alterando no solo la ubicación de este transportador en la célula según la concentración de calcio extracelular, sino también su capacidad de transporte de hierro desde el medio extracelular hacia los compartimentos intracelulares.

3.1 Introducción

Considerando que no existe un mecanismo de excreción controlado de hierro en los mamíferos (Ravia y col., 2005), la homeostasis de hierro en el cuerpo ocurre principalmente

por el control estricto de su absorción a través del epitelio duodenal (Ma y col., 2002; Andrews, 2008; Ganz, 2013). La absorción intestinal de hierro comprende tres pasos secuenciales: (i) la captación de hierro desde la luz intestinal; (ii) una fase intracelular, en la que el hierro se une a los componentes citosólicos; (iii) un paso de transferencia, en el que el hierro sale de las células hacia el plasma sanguíneo (Nuñez y Tapia, 1999). La captación de Fe^{2+} desde el lumen del intestino hacia el enterocito está mediada por el transportador de metal divalente 1 (DMT1), el cual cotransporta Fe^{2+} y protones mediante un mecanismo electrogénico (Andrews, 2008; Mackenzie y col., 2005; Dasa y Abera, 2018). El hierro sale del enterocito al torrente sanguíneo a través del transportador de salida ferroportina (FPN), único exportador de hierro celular conocido (Roughead y col., 2005). Por lo tanto, la absorción intestinal de hierro comprende la actividad coordinada de DMT1 y de FPN.

El movimiento vesicular de los transportadores entre la membrana plasmática y los dominios intracelulares es un mecanismo importante para regular la entrada de iones y metabolitos en períodos de tiempo relativamente cortos; así, el secuestro o inserción de una proteína de la membrana plasmática proporciona un mecanismo rápido y eficaz para regular su función (Nuñez, 2010; Nuñez y col., 2010).

Experimentos que utilizan microscopía confocal revelaron que en las células Caco-2 polarizadas y en el intestino duodenal de ratas sometidas a privación de hierro, DMT1 muestra una marcada distribución en la membrana de ribete de cepillo (BBM), pero la administración de hierro induce una rápida y significativa internalización dependiente del tiempo de DMT1 de la membrana apical a los dominios basales (Ma col., 2002; Ma y col., 2006; Nuñez, 2010). Esta redistribución de DMT1 se interpretó como evidencia de un proceso mediante el cual las vesículas que contienen DMT1 con hierro unido se fusionan con, y entregan su hierro a las vesículas que contienen apo-transferrina (Ma col., 2002; Ma y col., 2006). Además de la marcada distribución apical de DMT1 en condiciones de bajo contenido de hierro, también se reportó la presencia de DMT1 en los dominios basales de las células Caco-2 y enterocitos duodenales de rata, lo cual no sorprendió ya que se necesita DMT1 para el transporte de hierro fuera de la vesícula endocítica durante la endocitosis de transferrina basolateral (Nuñez y col., 2010).

Usando microscopía confocal, se encontró que, en el duodeno de rata y en células Caco-2, en condiciones de privación de hierro, FPN se localizó preferentemente en el dominio basolateral donde actúa como transportador de exportación de hierro, aunque también se observó una FPN considerable en el dominio apical cuyo papel se asoció a un flujo de hierro retrógrado de basal a apical en el que el hierro no unido a la transferrina en el plasma sanguíneo se transporta a la luz intestinal (Nuñez, 2010; Nuñez y col., 2010). Nuñez y col. (2010) observaron que la alimentación con hierro indujo una reducción de la FPN basolateral y un aumento de FPN apical, que no alcanzaron a ser significativos y, en conjunto con experimentos anteriores, concluyeron que el secuestro de DMT1 de la membrana apical y de FPN de la membrana basolateral luego de la alimentación con hierro debería estar destinado a disminuir sustancialmente la absorción intestinal de hierro.

Estudios de localización de membrana en estado estacionario en células Caco-2 polarizadas revelaron que el estado del hierro celular determinaba la distribución de DMT1 y FPN en la membrana apical/basolateral, y que los flujos de hierro estaban regulados por el suministro de hierro, ya que el aumento de la concentración de hierro en el compartimiento apical redujo la captación apical y el eflujo basal, y un desafío de hierro en el compartimiento basal aumentó el eflujo apical y la captación basal no asociada a transferrina de este metal, lo que demostró de ambos transportadores de hierro son funcionales en las membranas apical

y basolateral, por lo que los investigadores sugieren un nuevo mecanismo de regulación de la absorción intestinal de hierro basado en el reposicionamiento de DMT1 y FPN entre la membrana y los compartimentos intracelulares en función del suministro de hierro, el cual debería ser complementario a los mecanismos basados en las regulaciones transcripcionales o de traducción de las proteínas transportadoras de hierro (Nuñez y col., 2010). El aumento en el flujo de salida apical podría explicarse por los efectos combinados del aumento de FPN y la disminución de DMT1 en este dominio de membrana; sin embargo, la importancia de la actividad de captación basolateral no está clara, porque el hierro no unido a transferrina no se encuentra a menudo en el medio basolateral, aunque podría ser útil en enfermedades en las que se supera la capacidad de unión de hierro de la transferrina.

La evidencia experimental reportada en el capítulo previo de este manuscrito mostró que el calcio media una inhibición reversible no competitiva de la absorción de hierro en las células Caco-2, y se propuso que un mecanismo de inhibición no competitiva del calcio para la captación y transporte de hierro a través de DMT1, donde Ca^{2+} se une a un supuesto sitio alostérico no catalítico de DMT1. Sin embargo, hasta ahora no hay evidencia experimental reportada que haga seguimiento en tiempo real a DMT1 y FPN, para comprender cómo el calcio extracelular puede afectar el movimiento de estas proteínas transportadoras durante la absorción de hierro. Thompson y col. (2010) mostraron una disminución significativa de los niveles DMT1 en la membrana celular de las células Caco-2 polarizadas tratadas durante 4 horas con 2,5 mM de CaCl_2 , con 30 μM de citrato de amonio férrico o con ambos metales, sin efecto en la expresión celular total de DMT1; además, no observaron diferencias en la expresión de FPN total o en la fracción de FPN correspondiente a la membrana celular para los diferentes tratamientos. Sus hallazgos apoyan la hipótesis de que el calcio ejerce un efecto inhibitorio en la membrana apical al disminuir los niveles de DMT1 en la membrana celular. Sin embargo, varios autores (Gaitán y col., 2011b; Herrera y col., 2015; Beck y Coad, 2017) han señalado que el efecto inhibitorio observado puede resultar del uso de citrato, que es un inhibidor de la absorción de hierro en humanos. Por otro lado, Lönnnerdal (2010) incubó células Caco-2 polarizadas, en el medio apical con medio sin suero que contenía 1 μM de FeSO_4 (marcado con ^{59}Fe) junto con 0 o 100 μM de CaCl_2 , y encontró que después de 1,5 horas de exposición, la expresión de DMT1 total se redujo ligeramente ($p = 0,06$) y la expresión de FPN total no se vio afectada, pero la FPN unida a la superficie disminuyó significativamente.

En este capítulo caracterizamos la cinética de la relocalización de DMT1 y FPN entre los dominios apical y basolateral de células Caco-2 polarizadas utilizando microscopía confocal. Las células se transfectaron con los constructos pEGFP-C1-DMT1(1A/IRE(+)) y pTagRFP-C-FPN1 por lipofección, y su localización celular después de cambiar la concentración de calcio en el compartimiento apical, adicionando o no hierro junto con el cambio de concentración de calcio, se determinó a partir de imágenes capturadas desde la membrana basal hasta la membrana apical de cada célula analizada. El calcio extracelular a concentraciones de 1,5 mM y 3 mM indujo la relocalización de DMT1 desde los dominios apical a basal, pero, cuando la concentración de calcio fue de 10 μM , se acentuó la relocalización de DMT1 hacia el dominio apical. El hierro indujo una relocalización de DMT1 a los compartimentos intracelulares, que fue más rápida mientras menor era la concentración de Ca^{2+} extracelular. En el caso de FPN, los cambios que se indujeron en su localización no lograron ser estadísticamente significativos en ningunas de las condiciones experimentales estudiadas; por lo tanto, el efecto inhibitorio del calcio sobre la captación de hierro se ejerce efectivamente sobre DMT1. Los experimentos realizados indican por primera

vez que el ciclo endocítico de DMT1 en las células Caco-2 polarizadas está determinado no sólo por la presencia de hierro en el compartimiento apical, sino también por la concentración de calcio en ese compartimiento.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Cultivo de células

La línea celular Caco-2 se continuó utilizando para este estudio. Se sembraron las células Caco-2 a una densidad de 30.000 células por cm^2 , en insertos bicamerales con membrana de policarbonato permeable de 6,5 mm de diámetro, tamaño de poro de 0,4 μm y área de cultivo de 0,33 cm^2 (Transwell®, Corning Costar®), sobre placas de 24 pocillos. Las células se cultivaron durante 12–14 días en DMEM con SBF al 10 % y Pen/Strep al 1 %, manteniéndolas a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂ y 95% de aire. El medio de cultivo fue reemplazado cada dos días.

3.2.2 Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER)

La resistencia eléctrica transepitelial (TEER), en ohmios· cm^2 ($\Omega \cdot cm^2$), de las células Caco-2 cultivadas en los insertos bicamerales, se midió empleando un voltímetro con electrodos conocido como el sistema Millicell ERS-2 (ERS-2 *Epithelial Volt-Ohm-Meter*; Millipore) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En los experimentos realizados en este trabajo, se usaron insertos con TEER superior a 240 $\Omega \cdot cm^2$, para evaluar el crecimiento de la monocapa epitelial y la integridad de las uniones estrechas, ambos indicadores de la funcionalidad de la monocapa celular diferenciada de las células Caco-2 (Alvarez-Hernandez y col., 1991; Turco y col., 2011; Bricks y col., 2014; Ma y col., 2002). La resistencia eléctrica transepitelial (TEER) del intestino delgado humano es de 12-120 Ω/cm^2 (Briske-Anderson y col. 1997; Gupta y col. 2013; Takenaka y col. 2014). El TEER más elevado de las células Caco-2 se debe a que esta línea celular se originó en el intestino grueso y también tienen un radio de poro de unión estrecha promedio de 3,7 Å, en comparación con 8–13 Å para el intestino delgado humano nativo (Tavelin y col. 2003).

La medición del TEER es método sensible, ya que la presencia de pequeños espacios en la monocapa epitelial conduce a valores TEER cercanos a los niveles del área de cultivo sin células (Altay y col., 2019).

El TEER se evaluó al principio y al final de cada experimento y se calculó como:

$$TEER = (R_m - R_b) \cdot A_C \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

donde, R_m es la lectura de resistencia obtenida para la monocapa celular (en ohm), R_b es la lectura de resistencia obtenida para el inserto con medio MEM y sin células (100 ohm), y A_C es el área de cultivo del inserto, que en estos experimentos corresponde a 0,33 cm^2 .

3.2.3 Minipreparación de ADN plasmídico de DMT1-1A/IRE(+) y FPN1

Con el fin de lograr el aislamiento de ADN plasmídico desde los vectores de expresión EGFP-C1 y TagRFP-C, para la expresión de los genes de SLC11A2-1A/IRE(+) (DMT1-1A/IRE(+)) y SLC40A1 (FPN), respectivamente, se utilizó la metodología descrita a continuación:

1. En un tubo tipo Falcon de 50 mL que contenía 4 mL de medio LB con kanamicina a concentración de 30 µg/mL, se preparó un preinóculo añadiendo 100 µL de *E. coli* TOP10 que tiene clonado el vector de expresión de DMT1 1A/IRE(+). Este procedimiento se repitió para preparar un preinóculo para *E. coli* TOP10 que tiene clonado el vector de expresión de FPN. Estos dos preinóculos se incubaron por 6 horas a 37 °C con agitación a 200 rpm.
2. A continuación, se prepararon tres inóculos para el vector de expresión de DMT1 1A/IRE(+) y tres para el de FPN. Cada inóculo se preparó como sigue: en un tubo Falcon de 50 mL, se agregaron 4 mL de medio LB con kanamicina (a 30 µg/mL) y 400 µL del preinóculo respectivo. Los inóculos se incubaron por 16 horas a 37 °C con agitación a 200 rpm.
3. Cada cultivo se centrifugó a 13.000× por 1 minuto para obtener el sedimento (pellet) celular.
4. Para recuperar el ADN plasmídico de cada cultivo, se usó el kit de minipreparación de plásmidos *GeneJET* (Thermo Fisher Scientific). Este kit utiliza una tecnología de membrana a base de sílice en forma de una columna de centrifugado, y permite recuperar hasta 20 µg de ADN plasmídico de alto número de copias, y se usó siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, resumido en la [Figura 3.1](#) y descrito a continuación:

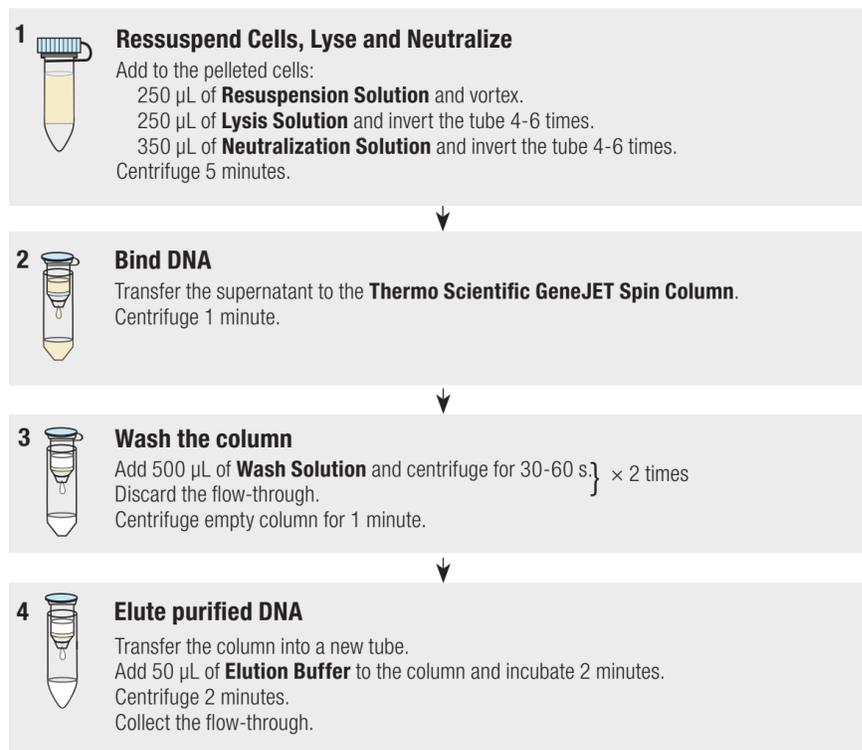


Figura 3.1. Protocolo resumido para *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*.
 Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0502#/K0502>.

- a) Suspender las células sedimentadas en 250 µL de la Solución de Resuspensión. Transferir la suspensión celular a un tubo de microcentrífuga y resuspender

- mediante agitación vorticial o pipeteo hacia arriba y hacia abajo hasta que no queden grumos de células.
- b) Agregar 250 μL de la Solución de Lisis y mezclar bien invirtiendo el tubo 4-6 veces hasta que la solución se vuelva viscosa y ligeramente transparente.
 - c) Agregar 350 μL de la Solución de Neutralización y mezclar inmediata y exhaustivamente invirtiendo el tubo 4-6 veces.
 - d) Centrifugar durante 5 minutos para sedimentar los desechos celulares y el ADN cromosómico.
 - e) Transferir el sobrenadante a la columna de centrifugación GeneJET mediante decantación o pipeteo.
 - f) Centrifugar durante 1 minuto. Desechar el flujo continuo y volver a colocar la columna en el mismo tubo de recolección.
 - g) Agregar 500 μL de la Solución de Lavado a la columna de centrifugación GeneJET. Centrifugar durante 30 a 60 segundos y desechar el flujo continuo. Luego, volver a colocar la columna en el mismo tubo de recolección.
 - h) Repetir el procedimiento de lavado utilizando 500 μL de solución de lavado.
 - i) Desechar el flujo continuo y centrifugar durante 1 minuto adicional para eliminar la solución de lavado residual. Este paso es esencial para evitar el etanol residual en las preparaciones de plásmidos.
 - j) Transferir la columna de centrifugación GeneJET a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Agregar 50 μL del Tampón de Elución al centro de la membrana de la columna GeneJET para eluir el ADN del plásmido. Incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar durante 2 minutos.
5. El ADN plasmídico purificado de cada cultivo se cuantificó utilizando el NanoDrop (MaestroGen, Fermelo Biotec), que es un cuantificador basado en absorbancia de la concentración de ácidos nucleicos y de proteínas, a partir de volúmenes pequeños de muestra (2 μL). Para garantizar la alta calidad, pureza, integridad y concentración del ADN plasmídico obtenido, se descartaron las muestras con relaciones A260/A280 y A260/A230 menores a 1,8, ya que indican una contaminación de la preparación de ácido nucleico con proteínas, y una contaminación orgánica con reactivos (como fenol, sales caotrópicas, etanol y trizol), respectivamente (Kim y Eberwine, 2010). Todas las muestras de ADN plasmídico aptas para su posterior uso tenían una concentración superior a 150 ng/ μL .
 6. El ADN del plásmido purificado así obtenido se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

3.2.4 Transfección transitoria en las células Caco-2

La transfección es un procedimiento que consiste en la incorporación de ácidos nucleicos exógenos en células eucariotas, incluidos: ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), así como pequeños ARN no codificantes como siARN (ARN de interferencia pequeño), shARN (ARN de horquilla pequeña) y miARN (micro-ARN) (Borawski y col., 2007; Yamano y col., 2010; Sork y col., 2016; Shi y col., 2018). En todos los casos, los ácidos nucleicos a transfectar deben permanecer en un solvente que no sea perjudicial para la salud celular y estar libres de proteínas, de otros ácidos nucleicos contaminantes y de productos químicos (Stewart y col., 2016).

Los materiales genéticos incorporados (ADN o ARN) existen en las células de forma estable o transitoria, según la naturaleza de los materiales genéticos (Recillas-Targa, 2006). En la transfección estable, los materiales genéticos introducidos se integran en el genoma nuclear del huésped y mantienen su expresión incluso después de que las células huéspedes se repliquen (Glover y col., 2005; Lufino y col., 2008). En cambio, los genes transfectados de forma transitoria solo se expresan durante un período de tiempo limitado, generalmente varios días, y no se integran en el genoma de la célula huésped, por lo que no se transmite a la descendencia celular (Kim y Eberwine, 2010; Lufino y col., 2008; Recillas-Targa, 2006). Tanto los vectores de ADN como los de ARN se pueden utilizar para la transfección transitoria, pero solo se pueden utilizar vectores de ADN para la transfección estable (Fus-Kujawa y col., 2021). La transfección transitoria a menudo se usa para estudiar los efectos de la expresión a corto plazo de genes o productos génicos, como la eliminación o el silenciamiento de genes con ARN inhibidores, o la producción de proteínas a pequeña escala (Fus-Kujawa y col., 2021). La transfección estable es un proceso más largo y arduo, por lo que su uso se reserva para la producción de proteínas a gran escala, la investigación sobre la regulación génica a largo plazo, la generación de líneas celulares estables, los estudios de farmacología a largo plazo y la terapia génica (Recillas-Targa, 2006; Kim y Eberwine, 2010).

Los métodos de transfección se clasifican en tres grupos: biológicos (transfección mediada por virus), químicos (utilizan polímeros catiónicos, fosfato de calcio, lípidos catiónicos o aminoácidos catiónicos) y físicos (microinyección, transfección óptica, transfección biolística y electroporación) (Schenborn y Goiffon, 2000; Pfeifer y Verma, 2001; Washbourne y McAllister, 2002; O'Brien y Lummis, 2011; Elsner y Bohne, 2017; Fus-Kujawa y col., 2021). Cada método tiene sus propias ventajas y desventajas, por lo que la selección del método óptimo depende del diseño experimental y el objetivo, considerando factores que incluyen el tipo y el origen de las células y la forma de los ácidos nucleicos introducidos (Mirska y col., 2005; Fus-Kujawa y col., 2021), y debe tener una alta eficiencia de transfección, baja toxicidad celular, efectos mínimos en la fisiología normal y ser fácil de usar y reproducible (Kim y Eberwine, 2010; Fus-Kujawa y col., 2021). Sin embargo, la entrega exitosa de material genético a las células, además del método de transfección, depende de: la cantidad, calidad y pureza del ADN; el tiempo de incubación y la proporción entre el reactivo de transfección y el ADN; el origen, tipo, número de pasaje y confluencia de las células transfectadas; la presencia o ausencia de suero en el cultivo celular; que el cultivo celular esté libre de contaminación (Fus-Kujawa y col., 2021).

Los métodos químicos tienen ventajas de citotoxicidad relativamente baja, sin mutagénesis, sin ADN portador adicional y sin limitación de tamaño en el ácido nucleico empaquetado (Kim y Eberwine, 2010). Los métodos químicos basados en lípidos catiónicos se han vuelto populares debido a su facilidad de uso, alta eficiencia del método y su aplicabilidad a una amplia variedad de tipos de células; además, permite entregar ADN, ARN y proteínas de una amplia gama de masas moleculares a la célula, y se emplea para transfecciones transitorias y estables (Huang y col., 2012; Paecharoenchai y col., 2012; Zhi y col., 2018; Stewart y col. 2016). La transfección de células con lípidos catiónicos se denomina lipofección (Zhi y col., 2018). Esta técnica utiliza lípidos/liposomas cargados positivamente (catiónicos) que son moléculas anfifílicas e interactúan electrostáticamente con residuos de fosfato cargados negativamente (aniónicos) de los ácidos nucleicos, lo que da como resultado la compactación del ácido nucleico en un complejo liposoma/ácido nucleico (Kabanov y Kabanov, 1995; Labat-Moleur y col. 1996). La entrada del complejo de liposomas en la célula puede ocurrir por endocitosis o fusión con la membrana plasmática a

través de los restos lipídicos del liposoma, seguida de liberación del complejo en el citoplasma (Gao y Huang, 1995). En ADN transfectado necesita ser transportado al núcleo, mientras que el ARN permanece dentro del citoplasma (Ewert y col., 2010).

La Lipofectamina™ 2000 (Life Technologies™, Invitrogen™) y sus derivados se utilizan ampliamente para experimentos de transfección transitorios y estables (Dalby y col., 2004). Es un reactivo de transfección utilizado en cultivos celulares *in vitro* para la transfección por lipofección de ARN (incluidos ARNm y ARNsi) o ADN plasmídico, y consiste en una formulación catiónica de liposomas, que forma complejos con moléculas de ácido nucleico cargadas negativamente para permitirles superar la repulsión electrostática de la membrana celular e ingresar en el citoplasma (Dalby y col., 2004; Šimčíková y col., 2015; Zylberberg y Matosevic, 2016).

Opti-MEM® I (Opti-MEM™ I *Reduced Serum Medium*, Gibco™), es una modificación del Medio Esencial Mínimo (MEM), tamponado con HEPES y bicarbonato de sodio, y suplementado con insulina, transferrina, hipoxantina, timidina, piruvato de sodio, L-glutamina y oligoelementos, lo cual permite una reducción de la suplementación de suero bovino fetal en al menos un 50 % sin cambios en la tasa de crecimiento o la morfología. El uso de este medio se recomienda con reactivos de transfección de lípidos catiónicos, como Lipofectamina™ 2000, ya que mejora la eficiencia de la transfección con respecto a los medios que deben suplementarse con SBF, debido a que las proteínas séricas compiten con los complejos de ADN plasmídico:liposomas por los receptores de la superficie celular para entrar en las células (Khammanit y col., 2008; Chen y col., 2017; Hu y col., 2018; Ivanovic y col., 2018; Zou y col., 2004).

Considerando los objetivos de los experimentos a desarrollar en este trabajo, para determinar, mediante microscopía confocal, el movimiento en tiempo real de DMT1-1A(+IRE) marcada con proteína fluorescente EGFP (DMT1-EGFP), y FPN marcada con proteína fluorescente TagRFP (FPN-TagRFP), inducido por la presencia de diferentes concentraciones de calcio extracelular, en presencia o en ausencia de un desafío de hierro no hemo extracelular, las células Caco-2 polarizadas se transfectaron de forma transitoria con los constructos pEGFP-C1-DMT1(1A/IRE(+)) y pTagRFP-C-FPN1 por lipofección, utilizando Lipofectamina™ 2000 como transportador del ADN plasmídico, como se describe a continuación:

1. Calcular el volumen de ADN plasmídico a utilizar por cada inserto.

$$Volumen_{ADNp}(\mu L) = \frac{\text{Área}_{inserto}(cm^2) \cdot ADN_{porinserto} \left(\frac{\mu g}{cm^2} \right)}{\text{Concentración de ADN} \left(\frac{\mu g}{\mu L} \right)} \cdot (n^{\circ}insertos) \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

donde, el área de cada inserto ($\text{Área}_{inserto}$) es de $0,33 \text{ cm}^2$, $\text{Concentración de ADN}$ es la concentración de ADN plasmídico obtenido por minipreparación y medido por NanoDrop, $n^{\circ}insertos$ es el número de insertos a transfectar, y la razón $ADN_{porinserto}$ utilizada en este trabajo fue de $2 \mu g/cm^2$.

2. Para cada inserto a transfectar, preparar las siguientes soluciones:
Solución 1: diluir $10 \mu L$ de Lipofectamina™ 2000 en $300 \mu L$ de *Opti-MEM® I*. Mezclar suavemente e incubar por 5 minutos.
Solución 2: diluir el volumen calculado de ADN plasmídico de DMT1 en *Opti-MEM® I* hasta completar $200 \mu L$. Mezclar suavemente e incubar por 5 minutos.

Solución 3: diluir el volumen calculado de ADN plasmídico de FPN en *Opti-MEM® I* hasta obtener 200 μL . Mezclar suavemente e incubar por 5 minutos.

3. Combinar las soluciones anteriores (volumen final de 700 μL), e incubar la mezcla por 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar el medio de los compartimientos apical y basolateral de los insertos, lavarlos con PBS, y agregar 100 μL de la solución con ADN en el compartimiento apical y 600 μL en el compartimiento basolateral.
5. Luego de 6 horas, retirar el medio de transfección y agregar en los compartimientos apical y basolateral DMEM suplementado con 10 % SBF, para ayudar a minimizar los efectos tóxicos del reactivo de transfección.

3.2.5 Lectura de la fluorescencia de DMT1-EGFP y FPN-TagRFP

Una vez formada la monocapa celular, 48 horas antes de la experimentación, se realizó la transfección transitoria del ADN plasmídico de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP en las células Caco-2, utilizando el reactivo Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen™), como se describió en la sección anterior.

Posteriormente, 24 horas antes de realizar los experimentos, se retiró el medio DMEM con 10 % SBF de los insertos, se lavaron los compartimientos apical y basal con PBS, y se agregó en ambos compartimientos medio MEM sin rojo fenol, con 1,5 mM de CaCl_2 y suplementado con 2 % de SBF bajo, con el fin de maximizar la ubicación de DMT1 en la membrana apical al privar a las células Caco-2 de hierro (Thumser y col., 2010; Ma y col., 2002), evitar la proliferación celular y disminuir la cantidad de transferrina disponible en el medio de cultivo (Huebers y col., 1987).

Justo antes de iniciar los experimentos, se retiró el medio de cultivo de los insertos, estos se lavaron con PBS, y se agregaron 10 μL de MEM sin rojo fenol y sin FBS, con concentración de calcio libre de 1,5 mM en el medio apical de los insertos.

Con el microscopio de barrido láser confocal Zeiss LSM710 Meta (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania), se localizó al menos una célula Caco-2 del inserto transfectada positivamente con los dos ADN plasmídicos (DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN- TagRFP) y usando el modo *zscan* del microscopio se realizó una lectura de la fluorescencia a lo largo del eje basal a apical (eje Z) de las células, tomando cortes ópticos fijos de 1,5 μm , que se utiliza como control de la localización de los transportadores al inicio de la observación.

Para analizar el efecto de la variación de la concentración de calcio extracelular en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, al finalizar la primera lectura de la fluorescencia en el eje basal a apical, se agregaron 65 μL de uno de los siguientes tres medios (sin suplementación con SBF), según el caso a analizar:

- a) MEM sin rojo fenol, con concentración de calcio libre reducida con EGTA, para que 75 μL los totales de medio en el compartimiento apical alcancen una concentración final de calcio de 10 μM ;
- b) MEM sin rojo fenol, con concentración de calcio libre de 1,5 mM en forma de CaCl_2 ;
- c) o MEM sin rojo fenol, suplementado con CaCl_2 , para que 75 μL los totales de medio en el compartimiento apical alcancen una concentración final de 3 mM de calcio libre; y las lecturas de la fluorescencia de DMT1-EGFP y FPN-TagRFP se continuaron por aproximadamente 40 minutos.

Para analizar el movimiento de DMT1 y FPN entre compartimentos celulares en función de un suministro de hierro y de la concentración de calcio extracelular, al finalizar la primera lectura de la fluorescencia en el eje basal a apical, se agregaron 70 μL de uno de los siguientes tres medios (sin suplementación con SBF), según el caso a analizar:

- d) MEM sin rojo fenol, con concentración de calcio libre reducida con EGTA, y con Sulfato de Amonio Ferroso (FAS), para que 80 μL los totales de medio en el compartimiento apical alcancen una concentración final de calcio de 10 μM y de FAS de 10 μM ;
- e) MEM sin rojo fenol, con concentración de calcio libre de 1,5 mM en forma de CaCl_2 , y con FAS a concentración final de 10 μM ;
- f) o MEM sin rojo fenol, suplementado con CaCl_2 y con FAS, para que 80 μL los totales de medio en el compartimiento apical alcancen una concentración final de calcio libre de 3 mM y de FAS de 10 μM ;

y la captura de cortes ópticos para realizar la lectura de la fluorescencia de DMT1-EGFP y FPN-TagRFP continuó por 40 minutos aproximadamente o hasta que la fluorescencia de ambos transportadores se apagó.

El seguimiento de la localización en el tiempo de DMT1-EGFP y FPN- TagRFP ante las diferentes condiciones experimentales propuestas, puede realizarse detectando el espectro de emisión de los fluoróforos EGFP y TagRFP con el microscopio confocal. El espectro de emisión de cada sonda fluorescente es emitido luego estimularla con ondas electromagnéticas de longitud de onda particular (espectro de absorción o excitación) (Vicente y col., 2007). Las proteínas fluorescentes EGFP y TagRFP tienen espectros de excitación/emisión de 488/526 nm y 543/623 nm , respectivamente, y su distribución intracelular puede obtenerse al mismo tiempo registrando sus señales de fluorescencia en canales de detección diferentes. Un objetivo de inmersión en aceite (63x/1.40) y un zoom de escaneo de 2.0 fue utilizado en las mediciones. Con el software ZEN 3.2 Blue Edition (ZEISS) se analizaron las mediciones de fluorescencia obtenidas en el microscopio confocal para DMT1-EGFP y FPN- TagRFP.

3.2.6 Corrección del fotoblanqueo de los valores de fluorescencia de DMT1 y de FPN

Las proteínas fluorescentes codificables genéticamente, como GFP y RFP, son herramientas de vital importancia ya que proporcionan información valiosa tanto en la investigación básica como en las aplicaciones clínicas (York y col., 2019). Estas proteínas son usadas ampliamente en aplicaciones de imágenes celulares para revelar la ubicación de las proteínas, para monitorear las respuestas y procesos celulares en tiempo real (Visser y col., 2009; Suhling y col., 2002)

La utilidad de una proteína fluorescente determinada para un experimento específico depende en gran medida de su brillo efectivo y fotoestabilidad general; sin embargo, el brillo de las proteínas fluorescentes está limitado por el fotoblanqueo irreversible de los fluoróforos (Chaudhry y col., 1989; Menter y col., 1995; Robinson y col., 1998; Dean y col., 2011). El fotoblanqueo es la disminución irreversible de la intensidad de la fluorescencia después de la exposición al láser de excitación, causado por el cambio químico de un fluoróforo excitado a una especie que no emite fluorescencia, eliminando así la información potencialmente útil que puede brindar la fluorescencia de la proteína (van den Engh y Farmer, 1992; Marcu y col., 1999; Lee y col., 2001; Dean y col., 2011).

Se han identificado diversos factores que causan el fotoblanqueo y que dificultan que este proceso pueda evitarse por completo, como: (i) la presencia de oxígeno en la muestra en estudio (por fotooxidación) (Benson y col., 1985), (ii) la intensidad de la radiación de excitación, ya que las intensidades altas implican altas tasas de fotoblanqueo (Marcu y col., 1999), (iii) el microentorno químico en el que se encuentra el fluoróforo (Ma y col., 2006). El oxígeno es el factor más importante que interviene en el fotoblanqueo, por lo que la literatura sugiere desoxigenar las muestras con argón o nitrógeno (Song y col., 1995; Ma y col., 2006). Sin embargo, en esta investigación la desoxigenación no podría implementarse ya que las células necesitan oxígeno.

En muestras biológicas complejas y heterogéneas, los fluoróforos generalmente se fotoblanquean a diferentes velocidades con la irradiación (Marcu y col., 1999). Las desintegraciones de la intensidad de la fluorescencia en las proteínas a menudo muestran un comportamiento complejo, cuyo origen puede resultar de múltiples conformaciones (estado fundamental), dinámicas de proteínas, relajación espectral u otras interacciones entre los fluoróforos y su entorno (Lakowicz, 1999). El decaimiento de la fluorescencia de una proteína generalmente se describe mediante un modelo multi-exponencial, ya que proporcionan un mejor ajuste que un modelo mono-exponencial (Lee y col., 2001; Włodarczyk y Kierdaszuk, 2003).

La descripción del decaimiento de la fluorescencia de una proteína con un modelo mono-exponencial está dada por:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

donde $I(t)$ es la intensidad de fluorescencia en el tiempo t , I_0 es la intensidad en $t = 0$, también conocido como la amplitud o el factor preexponencial, y τ es el tiempo de vida de la fluorescencia, que corresponde al tiempo que un fluoróforo permanece en su estado excitado después de la excitación, y depende del entorno que rodea al fluoróforo (presión, temperatura, etc.) (Hirayama y col., 1991; Lampert y col., 1983; Lee y col., 2001; Włodarczyk y Kierdaszuk, 2003; Visser y col., 2009). Se ha demostrado que el pH y la viscosidad no afectan el tiempo de vida de la fluorescencia (τ) de GFP y RFP (Heikal y col. 2001; Suhling y col. 2002).

Cuando los fluoróforos de la proteína fluorescente poseen más de un tiempo de vida, el decaimiento de la fluorescencia puede representarse con el modelo multi-exponencial dado por:

$$I(t) = \sum_{j=1}^M \alpha_j \cdot e^{-t/\tau_j} \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

donde α_j y τ_j representan las amplitudes y los tiempos de vida de los M componentes exponenciales del decaimiento de la fluorescencia, respectivamente (Włodarczyk y Kierdaszuk, 2003; Vicente y col., 2007; Laine y col., 2012).

Para las dos proteínas fluorescentes utilizadas en los experimentos desarrollados en este trabajo, el decaimiento de la fluorescencia es heterogéneo, debido a que en EGFP y TagRFP pueden existir en dos o más poblaciones principales donde la fluorescencia del fluoróforo en una conformación está más extinguida que la de la(s) otra(s) conformación(es) (Bae y col. 2003; Borst y col. 2005). Se demostró previamente que una función mono-exponencial no es un modelo adecuado para describir las mediciones del decaimiento de la fluorescencia de GFP y RFP, y se han propuesto modelos de decaimiento bi y tri-

exponenciales, dependiendo de la longitud de onda de excitación y emisión usada (Uskova y col., 2000; Cotlet y col., 2001; Heikal y col. 2001; Hess y col. 2003; York y col., 2019).

Considerando la evidencia anterior y el pronunciado fotoblanqueo que tiene lugar durante las lecturas de la fluorescencia de pEGFP-C1-DMT1(1A/IRE(+)) y pTagRFP-C-FPN1 obtenidas con microscopía confocal, es necesario realizar la corrección de los valores de fluorescencia obtenidos para lograr caracterizar efectivamente el movimiento de las proteínas transportadoras DMT1-1A/IRE(+) y FPN en las células Caco-2 inducido por la variación de la concentración de calcio extracelular, con/sin un desafío de hierro. Por ello, decaimiento de la fluorescencia de cada proteína analizada se ajustará a un modelo multi-exponencial, seleccionando aquel que brinde el mejor ajuste con el menor número de componentes exponenciales, y luego se realizará la corrección del fotoblanqueo de cada proteína. Para ello, se siguió la metodología descrita a continuación:

1. Utilizando el software *ZEN 3.2 Blue Edition*, visualizar las imágenes de fluorescencia obtenidas en el microscopio confocal, y seleccionar un área que durante todo el tiempo de observación y en todos los cortes tomados a lo largo del eje basal-apical, delimite la zona que se corresponda con el interior de la célula vista transversalmente. Luego, extraer los datos de fluorescencia correspondientes a la célula en estudio. Considerar que la célula pudo moverse durante el tiempo de observación; en ese caso, el área que delimita la célula debe moverse en el tiempo en el cual esta se movió, para que la delimite nuevamente, y desde ese tiempo los datos de fluorescencia se extraen desde la nueva ubicación de la célula.
2. Seleccionar varias áreas en las imágenes de fluorescencia obtenidas que no pertenezcan a la célula en estudio, de forma tal que estas áreas nunca se superpongan con zonas correspondientes al interior de una célula. Los datos así obtenidos corresponderán a la fluorescencia base (*background*) del inserto para cada espectro de fluorescencia analizado.
3. Calcular el promedio de la fluorescencia base (*background*) de EGFP y de TagRFP, para cada tiempo y cada corte en el eje basal-apical.
4. A las fluorescencias de las proteínas DMT1-EGFP y de FPN1-TagRFP de la célula en estudio, obtenidas con el software *ZEN 3.2 Blue Edition*, restarle el promedio de la fluorescencia base correspondiente, y así obtener la fluorescencia neta que representa a cada proteína transportadora observada en el interior de la célula.
5. Para secuencia de lectura tomada desde el extremo basal al apical de la célula, obtener la fluorescencia total de cada proteína fluorescente, sumando la fluorescencia de cada uno de los cortes ópticos tomados a lo largo del eje basal-apical.
6. Normalizar la fluorescencia total calculada para DMT1-EGFP y de FPN1-TagRFP.
7. Ajustar los datos de intensidad de fluorescencia normalizados de cada proteína a un modelo multi-exponencial que represente el decaimiento de esta fluorescencia. Este ajuste se realiza minimizando la suma del error cuadrático medio (MSE) entre el valor de fluorescencia medido y el valor de fluorescencia predicho utilizando modelos con uno, dos o más términos exponenciales. Luego, la bondad del ajuste de cada modelo se evalúa mediante el cálculo del coeficiente de determinación R^2 , seleccionando aquel que tenga el menor número de términos exponenciales, con un valor de R^2 cercano a 1 y que no sea significativamente menor que el R^2 del modelo con un término exponencial adicional.

8. Corregir el fotoblanqueo de DMT1-EGFP y de FPN1-TagRFP, dividiendo cada valor de la fluorescencia total original entre el valor dado por la función multi-exponencial encontrada para el instante de tiempo correspondiente.

$$Fluorescencia_{Totalcorregida}(t) = \frac{Fluorescencia_{Total}(t)}{I(t)} \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

9. Mostrar los cambios en la fluorescencia en los cortes ópticos tomados en el eje basal-apical de cada célula, y así visualizar y analizar la cinética del movimiento de DMT1 y de FPN en las células Caco-2 polarizadas después exponerlas a diferentes concentraciones de calcio en el medio apical, suplementando o no con hierro.

3.2.7 Perfiles de distribución de DMT1 y de FPN

Con el objetivo de comparar la localización de DMT1 y FPN desde la membrana basal a la apical en las células observadas bajo las mismas condiciones experimentales, y así determinar si dicha localización se vio o no afectada de manera similar, se decidió graficar los perfiles de distribución de estas proteínas según los valores de fluorescencia obtenidos. Para ello, una vez corregido el efecto del fotoblanqueo en la fluorescencia de DMT1 y de FPN, se siguió la metodología descrita a continuación:

- (i) Teniendo en cuenta que la altura de las células Caco-2 analizadas no son iguales, se normalizó el número de cortes ópticos obtenidos en cada caso a valores entre 0 y 1, utilizando la siguiente ecuación para obtener el eje basal-apical normalizado:

$$N^{\circ}corte_{normalizado} = \frac{N^{\circ}corte_{actual} - 1}{N^{\circ}cortes_{totales} - 1} \quad (\text{Ecuación 3.6})$$

- (ii) El área bajo la curva obtenida al graficar la fluorescencia alcanzada por DMT1 o FPN en cada corte óptico realizado el eje basal-apical de cada célula para un instante de tiempo determinado, es decir, el área bajo la curva obtenida al graficar el perfil de distribución de cada proteína es directamente proporcional a la concentración de la proteína analizada en cada una de las células. Considerando que esta concentración en cada corte óptico variará según la altura de la célula, es necesario normalizar el área bajo la curva de cada perfil de distribución en cada instante de tiempo antes de compararlos entre sí. Para ello:

1) Calcular el área bajo la curva. En este trabajo, se utilizó el método trapezoidal para calcular esta área con respecto la separación escalar especificada por el número de cortes ópticos de cada caso. Para ello, se divide el área en trapezoides equidistantes, se calcula el área de cada trapezoide, y se suman estas áreas, como lo indica la siguiente ecuación (Goodwin, 1949; Kalambet y col., 2018):

$$\text{Área}_{BC} = \frac{1}{2 \cdot nc} \cdot \left[I(0) + 2 \cdot I\left(0 + \frac{1}{nc}\right) + 2 \cdot I\left(0 + 2 \cdot \frac{1}{nc}\right) + \dots + I(1) \right] \quad (\text{Ecuación 3.7})$$

donde Área_{BC} representa el área bajo la curva, nc es igual al número de cortes ópticos totales menos 1 ($nc = n^{\circ}_{cortes_totales} - 1$), y finalmente $I(nc)$ es la intensidad de la fluorescencia de la proteína analizada para cada corte óptico normalizado.

2) Dividir la fluorescencia obtenida para cada corte óptico entre el área bajo la curva calculada para el instante de tiempo analizado.

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Efecto del calcio extracelular en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN

Se investigó el efecto de aumentar las concentraciones de calcio extracelular ($10 \mu M$, $1,5 mM$ o $3 mM Ca^{2+}$) en el compartimiento apical de las células Caco-2 polarizadas sobre el movimiento en tiempo real de los transportadores DMT1 y FPN entre las membranas apical y basal. Para ello, las células Caco-2 se cultivaron en insertos bicamerales, se transfectaron con los constructos pEGFP-C1-DMT1(1A/IRE(+)) y pTagRFP-C-FPN1 y un día antes de seguir el movimiento de DMT1 y FPN mediante microscopía confocal, las células se incubaron en medio MEM bajo en hierro (2 % SBF). Antes y después de la realización de los experimentos se verificó que el TEER de cada inserto fuese superior a $240 \Omega \cdot cm^2$, para garantizar la funcionalidad de la monocapa de las células Caco-2.

Para cada concentración de calcio extracelular analizada, se visualizaron 7 células. En las Tablas 3.1, 3.2 y 3.3 se resumen las principales características de cada célula Caco-2 en la cual se estudió el posicionamiento de los transportadores DMT1 y FPN utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM710, empleando cortes ópticos de $1,5 \mu m$.

Realizada la medición de la fluorescencia de los transportadores DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP con microscopía confocal, se inició la etapa del procesamiento de las mediciones obtenidas. En primer lugar, para cada una de las 7 células Caco-2 analizadas en cada condición experimental, se seleccionó un área que corresponde a la célula de interés en todos los cortes ópticos capturados. Luego, se seleccionaron ocho áreas (pequeños cuadrados) en las que nunca se encontrara ni la célula estudiada ni alguna otra célula, de forma tal que estas ocho zonas sólo correspondan a la fluorescencia base (*background*) del inserto para cada imagen capturada. En la Figura 3.2 se muestran las áreas seleccionadas para la célula Caco-2 número 1 observada cuando la concentración de calcio extracelular analizada era de $10 \mu M Ca^{2+}$. La selección de las áreas para el resto de las células se encuentra en las secciones A.3.1, A.3.2 y A.3.3 de Anexos.

Para cada célula, una vez extraídos los datos de las mediciones de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP, se promedió la fluorescencia base de las ocho áreas seleccionadas para cada fluoróforo medido, y este promedio se le restó a la medición de fluorescencia del transportador respectivo en la célula, para obtener así la fluorescencia correspondiente netamente a la proteína transportadora de interés.

Tabla 3.1. Características de la visualización de las proteínas DMT1-EGFP y FPN1-TagRFP en cada célula Caco-2, utilizando microscopía confocal, cuando la concentración de calcio extracelular era de $10 \mu M$.

Célula Caco-2 N°	N° de cortes ópticos en el eje basal-apical	Altura de la célula Caco-2	Tiempo de observación de un barrido en el eje basal-apical	Tiempo de observación total
1	12	$16,5 \mu m$	3 min	45 min
2	11	$15 \mu m$	3 min	24 min
3	11	$15 \mu m$	3 min	24 min
4	13	$18 \mu m$	3 min	42 min
5	13	$18 \mu m$	3 min	42 min
6	13	$18 \mu m$	3 min	42 min
7	13	$18 \mu m$	3 min	42 min

Tabla 3.2. Características de la visualización de las proteínas DMT1-EGFP y FPN1-TagRFP en cada célula Caco-2, utilizando microscopial confocal, cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM.

Célula Caco-2 N°	N° de cortes ópticos en el eje basal-apical	Altura de la célula Caco-2	Tiempo de observación de un barrido en el eje basal-apical	Tiempo de observación total
1	17	24 μm	3,61 min	36,12 min
2	17	24 μm	3,61 min	36,12 min
3	12	16,5 μm	3 min	30 min
4	18	25,5 μm	3,82 min	30,59 min
5	13	18 μm	3,82 min	30,59 min
6	14	19,5 μm	3 min	27 min
7	17	24 μm	3,61 min	28,89 min

Tabla 3.3. Características de la visualización de las proteínas DMT1-EGFP y FPN1-TagRFP en cada célula Caco-2, utilizando microscopial confocal, cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM.

Célula Caco-2 N°	N° de cortes ópticos en el eje basal-apical	Altura de la célula Caco-2	Tiempo de observación de un barrido en el eje basal-apical	Tiempo de observación total
1	13	18 μm	3 min	42 min
2	13	18 μm	3 min	42 min
3	13	18 μm	3 min	42 min
4	12	16,5 μm	3 min	45 min
5	14	19,5 μm	3 min	45 min
6	14	19,5 μm	3 min	45 min
7	14	19,5 μm	3 min	45 min

Teniendo en cuenta el pronunciado fotoblanqueo que ocurre durante la medición de la fluorescencia, se realizó la corrección de los valores de fluorescencia obtenidos para recuperar la información suprimida por la disminución irreversible de la intensidad de la fluorescencia. Para ello, se calcularon funciones mono, bi y tri-exponenciales para representar el decaimiento de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y de FPN1-TagRFP en cada célula observada. Estas funciones se presentan en las [Tablas 3.4, 3.5 y 3.6](#).

El decaimiento de la fluorescencia de los transportadores, en alrededor de la mitad de los casos, se pueden ajustar con una función bi-exponencial; sin embargo, analizando el coeficiente de determinación (R^2), se observa que en el resto de los casos la función bi-exponencial no brinda un buen ajuste y, en cambio las funciones tri-exponenciales proporcionan un ajuste satisfactorio. Por lo tanto, considerando la bondad de los ajustes obtenidos y los reportes de literatura donde se han utilizado modelos de decaimiento exponencial triple ([Uskova y col., 2000](#); [Cotlet y col., 2001](#); [Heikal y col. 2001](#); [Hess y col. 2003](#); [York y col., 2019](#)), se seleccionaron las funciones tri-exponenciales encontradas para ajustar el decaimiento de las fluorescencias de DMT1-EGFP y FPN-TagRFP para todas las células. El enfoque tri-exponencial considera tres poblaciones diferentes del cromóforo:

$$I(t) = \alpha_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + \alpha_2 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} + \alpha_3 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_3}} \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

donde α_1 , α_2 y α_3 representan las amplitudes o intensidades iniciales de fluorescencia para cada una de las tres conformaciones asumidas para cada cromóforo, y τ_1 , τ_2 y τ_3 representan los tiempos de vida de cada una de estas tres conformaciones (Włodarczyk y Kierdaszuk, 2003; Vicente y col., 2007; Laine y col., 2012).

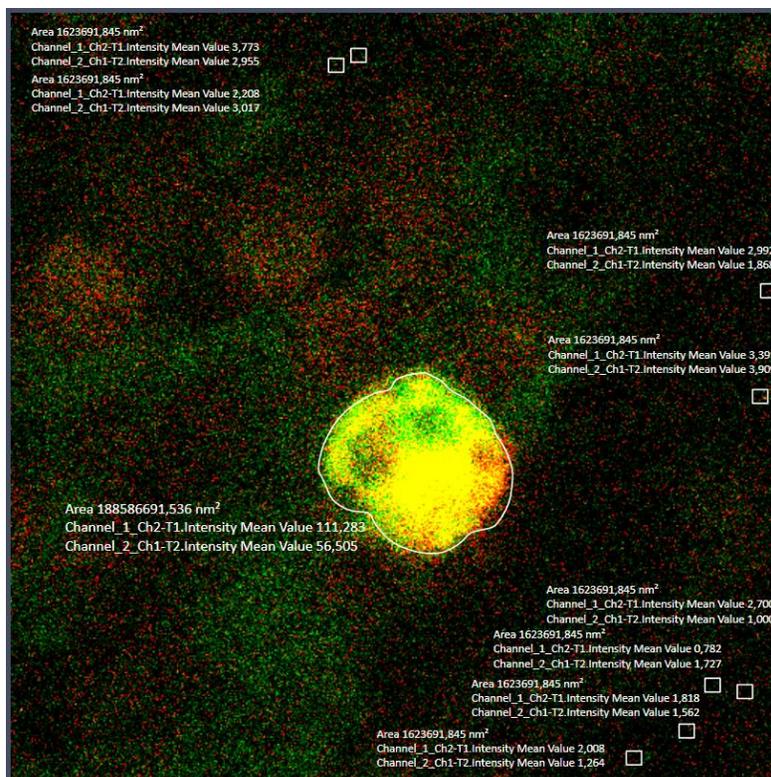


Figura 3.2. Selección del área correspondiente a la célula Caco-2 #1 analizada cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μM , y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

La corrección del fotoblanqueo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN-TagRFP se obtuvo luego de dividir la fluorescencia original de estas sondas en cada instante de tiempo muestreado, entre el valor predicho por la función tri-exponencial en ese tiempo, como se indicó en la Ecuación 3.5.

La distribución de DMT1 y FPN entre los dominios apical–basal de cada célula Caco-2 estudiada durante el tiempo de observación se presenta desde la Figura 3.3 a la Figura 3.8.

Hasta la fecha no se ha reportado explícitamente el porcentaje de DMT1 o de FPN que se localiza en las membranas apicales o basales de las células Caco-2 polarizadas luego de someterlas a una privación de hierro. Por ello, para determinar cuántos cortes ópticos se considerarán que forman parte de la membrana apical o de la basal, se consideró la información expuesta a continuación:

- Se ha reportado que, en el estado basal, solo el 5% del transportador de glucosa 4 (Glut4) total está localizado en la membrana plasmática, y que este transportador experimenta un lento ciclo endocítico-exocítico entre los compartimentos intracelulares y la membrana plasmática. Sin embargo, la tasa de exocitosis de Glut4 aumenta notablemente en

- respuesta a la estimulación con insulina, de reubicándose aproximadamente el 50% de la proteína Glut4 en la superficie celular (Hou y Pessin, 2007).
- En estudios de depleción de hierro, ratones de la cepa 129sv recibieron una dieta baja en hierro durante un período de 8 semanas, y después de la depleción de hierro inducida por la dieta, la expresión de DMT1 aumentó drásticamente (por un factor de 50 a 100 veces) en la primera parte del intestino delgado, correspondiente al duodeno proximal de los ratones (Canonne-Hergaux y col., 1999).

Examinando los cortes más apicales de cada célula, y asumiendo que la membrana apical está conformada por una quinta parte de todos los cortes ópticos en los cuales se dividió cada célula transversalmente, se encontró que cerca del 30 % de DMT1 estaba ubicado la quinta parte más apical de la célula, lo cual es un valor realista teniendo en cuenta los resultados de los reportes presentados anteriormente; podrían tomarse más cortes ópticos dividiendo la altura de la célula por ejemplo en cuatro o tres partes, pero esto posiblemente implicaría incluir dominios intracelulares dentro de lo que se considerará la membrana apical. Por otro lado, teniendo en cuenta que la membrana basal es más delgada que la apical ya que no presenta microvellosidades, se considerará que para cada célula la membrana basal tendrá un corte óptico menos que los considerados para la membrana apical, excepto los casos donde se tomaría un solo corte óptico, pues teniendo en cuenta que las células no poseen una altura homogénea, sino que más bien la mayoría presenta cierto grado de inclinación, posiblemente un único corte óptico tomaría proteínas que constituyen la membrana basal como parte del citosol basal periférico. Por ello, se estableció que la quinta parte más apical de la célula será la membrana apical, y la quinta parte más basal de la célula menos un corte óptico será la membrana basal, como se señala de las [Figura 3.3](#) a la [Figura 3.8](#).

Para cada célula se graficaron los perfiles de distribución de cada proteína a lo largo del eje basal–apical para tres lecturas de la fluorescencia de la célula completa: (i) la inicial, (ii) la inmediatamente posterior a la adición del medio con la concentración de calcio a analizar, y (iii) la correspondiente a la lectura obtenida aproximadamente a los 24 minutos de observación, que corresponden con el tiempo de observación total de las células 2 y 3 de la [Tabla 3.1](#), la cuales tuvieron el tiempo de observación más corto. Los perfiles de distribución obtenidos tanto para DMT1 como para FPN se muestran en las [Figuras 3.9 – 3.14](#). Además, las fracciones de DMT1 y FPN en las membranas apical y basal, luego de incubar las células con las diferentes concentraciones de calcio analizadas, variaron como se muestra en las [Figuras 3.15 – 3.18](#).

Al inicio de todas las observaciones para DMT1, tanto en el conjunto de [Figuras 3.3–3.5](#) como en la [Figura 3.9](#) y en la [Figura 3.15](#), como se esperaba luego de someter a las células a una privación de hierro por 24 horas, se observó un alto grado de localización en la región apical para DMT1. Además, se evidenció la presencia de DMT1 en la membrana basal de las células Caco-2 al inicio de cada observación; esto era esperable ya que el DMT1 es necesario para el transporte de hierro fuera de las vesículas endocíticas (Tabuchi y col., 2002), y esta distribución basal de DMT1 se ha reportado previamente en el duodeno de ratas y en células Caco-2 (Yeh y col., 2000; Arredondo y col., 2006; Nuñez, 2010). Así mismo, al inicio de todas las observaciones para FPN, tanto en el conjunto de [Figuras 3.6–3.8](#), como en la [Figura 3.12](#) y en la [Figura 3.18](#), se puede apreciar un predominio de FPN en la región basal, pero también se observó la presencia de FPN en el dominio apical de las células, tal como se había reportado anteriormente por otros investigadores (Nuñez, 2010; Ma y col., 2006b; Thomas y Oates, 2004).

Tabla 3.4. Curvas multi-exponenciales que predicen el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP para cada célula Caco-2 estudiada, cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μM .

Célula N°	Función Mono-Exponencial	Función Bi-Exponencial	Función Tri-Exponencial
1	$I_{DMT1}(t) = 0,84794 \cdot e^{-0,04198 \cdot t}$ $R^2 = 0,96666$	$I_{DMT1}(t) = 0,23380 \cdot e^{-0,62363 \cdot t} + 0,76698 \cdot e^{-0,03789 \cdot t}$ $R^2 = 0,99886$	$I_{DMT1}(t) = 0,28293 \cdot e^{-0,48362 \cdot t} + 0,77004 \cdot e^{-0,02851 \cdot t} - 0,05198 \cdot e^{+0,01291 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,02955 \cdot e^{-0,04240 \cdot t}$ $R^2 = 0,99135$	$I_{FPN}(t) = 3,24732 \cdot e^{-0,02871 \cdot t} - 2,25575 \cdot e^{-0,02464 \cdot t}$ $R^2 = 0,99246$	$I_{FPN}(t) = 0,81100 \cdot e^{-0,03489 \cdot t} + 1,49113 \cdot e^{-0,02526 \cdot t} - 1,30978 \cdot e^{+0,02145 \cdot t}$ $R^2 = 0,99252$
2	$I_{DMT1}(t) = 1,54354 \cdot e^{-0,14199 \cdot t}$ $R^2 = 0,87773$	$I_{DMT1}(t) = -123,10246 \cdot e^{-0,20908 \cdot t} + 124,09509 \cdot e^{-0,20687 \cdot t}$ $R^2 = 0,99951$	$I_{DMT1}(t) = -21,48619 \cdot e^{-0,17633 \cdot t} + 72,58196 \cdot e^{-0,14971 \cdot t} - 50,10050 \cdot e^{-0,14222 \cdot t}$ $R^2 = 0,99996$
	$I_{FPN}(t) = 1,46093 \cdot e^{-0,14281 \cdot t}$ $R^2 = 0,89453$	$I_{FPN}(t) = -118,72017 \cdot e^{-0,20766 \cdot t} + 119,71199 \cdot e^{-0,20560 \cdot t}$ $R^2 = 0,99573$	$I_{FPN}(t) = 38,84916 \cdot e^{-0,23173 \cdot t} + 0,44106 \cdot e^{-15,84585 \cdot t} - 38,29014 \cdot e^{-0,24267 \cdot t}$ $R^2 = 0,99826$
3	$I_{DMT1}(t) = 1,29712 \cdot e^{-0,06187 \cdot t}$ $R^2 = 0,86961$	$I_{DMT1}(t) = -8,92772 \cdot e^{0,01382 \cdot t} + 10,01218 \cdot e^{0,00973 \cdot t}$ $R^2 = 0,96788$	$I_{DMT1}(t) = -8,48010 \cdot e^{-0,1375 \cdot t} + 9,49625 \cdot e^{-0,11634 \cdot t} - 0,02275 \cdot e^{-0,00080 \cdot t}$ $R^2 = 0,99989$
	$I_{FPN}(t) = 1,25999 \cdot e^{-0,05986 \cdot t}$ $R^2 = 0,87946$	$I_{FPN}(t) = -6,59073 \cdot e^{0,01700 \cdot t} + 7,64935 \cdot e^{0,01167 \cdot t}$ $R^2 = 0,98128$	$I_{FPN}(t) = 4,57748 \cdot e^{-0,08206 \cdot t} - 3,34858 \cdot e^{-0,12216 \cdot t} - 0,23532 \cdot e^{-0,00355 \cdot t}$ $R^2 = 0,99848$
4	$I_{DMT1}(t) = 1,0595 \cdot e^{-0,0300 \cdot t}$ $R^2 = 0,93867$	$I_{DMT1}(t) = 1,16265 \cdot e^{-0,03372 \cdot t} + 0,16202 \cdot e^{-0,24726 \cdot t}$ $R^2 = 0,95076$	$I_{DMT1}(t) = 1,99880 \cdot e^{0,01416 \cdot t} - 1,98791 \cdot e^{0,05078 \cdot t} + 0,98417 \cdot e^{0,0625 \cdot t}$ $R^2 = 0,99979$
	$I_{FPN}(t) = 1,0300 \cdot e^{-0,0300 \cdot t}$ $R^2 = 0,94778$	$I_{FPN}(t) = 1,1281 \cdot e^{-0,0325 \cdot t} + 0,1311 \cdot e^{-0,2255 \cdot t}$ $R^2 = 0,9526$	$I_{FPN}(t) = 1,32520 \cdot e^{-0,00728 \cdot t} + 0,00005 \cdot e^{0,22003 \cdot t} - 0,32174 \cdot e^{0,02716 \cdot t}$ $R^2 = 0,99920$
5	$I_{DMT1}(t) = 1,07238 \cdot e^{-0,02947 \cdot t}$ $R^2 = 0,96458$	$I_{DMT1}(t) = 1,18507 \cdot e^{-0,03303 \cdot t} + 0,18721 \cdot e^{-0,24557 \cdot t}$ $R^2 = 0,97813$	$I_{DMT1}(t) = 27,85850 \cdot e^{0,0278 \cdot t} - 28,58171 \cdot e^{0,03049 \cdot t} + 1,72513 \cdot e^{0,04921 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,08590 \cdot e^{-0,0300 \cdot t}$ $R^2 = 0,95920$	$I_{FPN}(t) = 1,21131 \cdot e^{-0,03384 \cdot t} + 0,21657 \cdot e^{-0,21418 \cdot t}$ $R^2 = 0,97636$	$I_{FPN}(t) = 4,80386 \cdot e^{0,02151 \cdot t} - 4,09318 \cdot e^{0,03243 \cdot t} + 0,28782 \cdot e^{0,06562 \cdot t}$ $R^2 = 0,99952$
6	$I_{DMT1}(t) = 1,2286 \cdot e^{-0,0416 \cdot t}$ $R^2 = 0,9175$	$I_{DMT1}(t) = -104,53619 \cdot e^{-0,06987 \cdot t} + 105,47611 \cdot e^{-0,06917 \cdot t}$ $R^2 = 0,97919$	$I_{DMT1}(t) = 122,67769 \cdot e^{0,00629 \cdot t} + 0,03813 \cdot e^{-3,30813 \cdot t} - 121,71583 \cdot e^{0,00646 \cdot t}$ $R^2 = 0,99947$
	$I_{FPN}(t) = 1,31770 \cdot e^{-0,04684 \cdot t}$ $R^2 = 0,91078$	$I_{FPN}(t) = -84,37444 \cdot e^{-0,08128 \cdot t} + 85,35030 \cdot e^{-0,08012 \cdot t}$ $R^2 = 0,99416$	$I_{FPN}(t) = -5,78564 \cdot e^{-0,0638 \cdot t} + 7,94499 \cdot e^{-0,04889 \cdot t} - 1,16842 \cdot e^{-0,02083 \cdot t}$ $R^2 = 0,99852$
7	$I_{DMT1}(t) = 1,12425 \cdot e^{-0,03355 \cdot t}$ $R^2 = 0,97102$	$I_{DMT1}(t) = -0,82504 \cdot e^{-0,09762 \cdot t} + 1,81327 \cdot e^{-0,04575 \cdot t}$ $R^2 = 0,99797$	$I_{DMT1}(t) = -0,50477 \cdot e^{-0,26080 \cdot t} + 0,20245 \cdot e^{-1,34611 \cdot t} + 1,30225 \cdot e^{-0,03833 \cdot t}$ $R^2 = 0,99889$
	$I_{FPN}(t) = 1,09194 \cdot e^{-0,03556 \cdot t}$ $R^2 = 0,97314$	$I_{FPN}(t) = -0,20294 \cdot e^{-0,40344 \cdot t} + 1,19720 \cdot e^{-0,03950 \cdot t}$ $R^2 = 0,98891$	$I_{FPN}(t) = -1,70090 \cdot e^{-0,19041 \cdot t} + 1,86143 \cdot e^{-0,14360 \cdot t} + 0,82954 \cdot e^{-0,02928 \cdot t}$ $R^2 = 0,99332$

Tabla 3.5. Curvas multi-exponenciales que predicen el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP para cada célula Caco-2 estudiada, cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM.

Célula N°	Función Mono-Exponencial	Función Bi-Exponencial	Función Tri-Exponencial
1	$I_{DMT1}(t) = 1,02570 \cdot e^{-0,02555 \cdot t}$ $R^2 = 0,99791$	$I_{DMT1}(t) = -0,05041 \cdot e^{-0,44279 \cdot t} + 1,05010 \cdot e^{-0,02656 \cdot t}$ $R^2 = 0,99976$	$I_{DMT1}(t) = 0,99409 \cdot e^{-0,02934 \cdot t} - 0,05201 \cdot e^{-1,16435 \cdot t} + 0,05779 \cdot e^{-0,00282 \cdot t}$ $R^2 = 0,99991$
	$I_{FPN}(t) = 1,13396 \cdot e^{-0,01995 \cdot t}$ $R^2 = 0,92185$	$I_{FPN}(t) = -0,21291 \cdot e^{-8,17005 \cdot t} + 1,21291 \cdot e^{-0,02274 \cdot t}$ $R^2 = 0,99017$	$I_{FPN}(t) = 1,02239 \cdot e^{-0,04134 \cdot t} - 0,31134 \cdot e^{-0,48284 \cdot t} + 0,28885 \cdot e^{0,00325 \cdot t}$ $R^2 = 0,99353$
2	$I_{DMT1}(t) = 1,06906 \cdot e^{-0,01929 \cdot t}$ $R^2 = 0,97030$	$I_{DMT1}(t) = -0,11659 \cdot e^{-9,17169 \cdot t} + 1,11659 \cdot e^{-0,02119 \cdot t}$ $R^2 = 0,99423$	$I_{DMT1}(t) = -0,16644 \cdot e^{-1,68878 \cdot t} + 0,80260 \cdot e^{-0,04063 \cdot t} + 0,36399 \cdot e^{-0,00049 \cdot t}$ $R^2 = 0,99997$
	$I_{FPN}(t) = 1,09780 \cdot e^{-0,01407 \cdot t}$ $R^2 = 0,80480$	$I_{FPN}(t) = -0,17936 \cdot e^{-9,41089 \cdot t} + 1,17936 \cdot e^{-0,01722 \cdot t}$ $R^2 = 0,87484$	$I_{FPN}(t) = -0,34972 \cdot e^{-2,01033 \cdot t} + 0,65787 \cdot e^{-0,00026 \cdot t} + 0,69187 \cdot e^{-0,07910 \cdot t}$ $R^2 = 0,92891$
3	$I_{DMT1}(t) = 1,24461 \cdot e^{-0,04615 \cdot t}$ $R^2 = 0,90058$	$I_{DMT1}(t) = 9,80143 \cdot e^{-0,08627 \cdot t} - 8,81801 \cdot e^{-0,09907 \cdot t}$ $R^2 = 0,99483$	$I_{DMT1}(t) = -0,18992 \cdot e^{-0,27194 \cdot t} + 31,66373 \cdot e^{-0,00111 \cdot t} - 30,47618 \cdot e^{-0,00010 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,25964 \cdot e^{-0,05040 \cdot t}$ $R^2 = 0,89859$	$I_{FPN}(t) = -9,56113 \cdot e^{-0,10576 \cdot t} + 10,54302 \cdot e^{-0,09272 \cdot t}$ $R^2 = 0,99659$	$I_{FPN}(t) = 3,68637 \cdot e^{-0,05709 \cdot t} - 2,27180 \cdot e^{-0,09920 \cdot t} - 0,42239 \cdot e^{-0,00867 \cdot t}$ $R^2 = 0,99899$
4	$I_{DMT1}(t) = 0,96940 \cdot e^{-0,02019 \cdot t}$ $R^2 = 0,99325$	$I_{DMT1}(t) = 0,71296 \cdot e^{-0,03313 \cdot t} + 0,27348 \cdot e^{0,00003 \cdot t}$ $R^2 = 0,99670$	$I_{DMT1}(t) = 0,06998 \cdot e^{-0,37705 \cdot t} - 1,08523 \cdot e^{-0,00531 \cdot t} + 2,01552 \cdot e^{-0,0108 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 0,99358 \cdot e^{-0,01949 \cdot t}$ $R^2 = 0,99731$	$I_{FPN}(t) = 0,56136 \cdot e^{-0,03495 \cdot t} + 0,44545 \cdot e^{-0,00609 \cdot t}$ $R^2 = 0,99849$	$I_{FPN}(t) = 0,64532 \cdot e^{-0,03279 \cdot t} - 1,71309 \cdot e^{-0,00260 \cdot t} + 2,07486 \cdot e^{-0,00273 \cdot t}$ $R^2 = 0,99848$
5	$I_{DMT1}(t) = 1,00607 \cdot e^{-0,03311 \cdot t}$ $R^2 = 0,99488$	$I_{DMT1}(t) = 1,08147 \cdot e^{-0,02491 \cdot t} - 0,09902 \cdot e^{0,01338 \cdot t}$ $R^2 = 0,99708$	$I_{DMT1}(t) = 7,68939 \cdot e^{-0,00592 \cdot t} + 0,06103 \cdot e^{-2,11238 \cdot t} - 6,75043 \cdot e^{-0,00348 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,0399 \cdot e^{-0,0352 \cdot t}$ $R^2 = 0,99345$	$I_{FPN}(t) = 1,23841 \cdot e^{-0,02164 \cdot t} - 0,23349 \cdot e^{0,00808 \cdot t}$ $R^2 = 0,99889$	$I_{FPN}(t) = 1,43595 \cdot e^{-0,02143 \cdot t} - 0,01671 \cdot e^{-1,28254 \cdot t} - 0,41933 \cdot e^{-0,00128 \cdot t}$ $R^2 = 0,99895$
6	$I_{DMT1}(t) = 1,00935 \cdot e^{-0,00558 \cdot t}$ $R^2 = 0,93617$	$I_{DMT1}(t) = 1,02931 \cdot e^{-0,00651 \cdot t} + 0,03739 \cdot e^{-0,25802 \cdot t}$ $R^2 = 0,95714$	$I_{DMT1}(t) = -0,51355 \cdot e^{-0,09435 \cdot t} + 0,19122 \cdot e^{-0,21818 \cdot t} + 1,32226 \cdot e^{-0,01465 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 0,99981 \cdot e^{-0,01213 \cdot t}$ $R^2 = 0,97656$	$I_{FPN}(t) = 0,14801 \cdot e^{-0,06033 \cdot t} + 0,86401 \cdot e^{-0,00786 \cdot t}$ $R^2 = 0,98069$	$I_{FPN}(t) = -0,07665 \cdot e^{-1,07239 \cdot t} + 0,14152 \cdot e^{-0,18974 \cdot t} + 0,93521 \cdot e^{-0,00915 \cdot t}$ $R^2 = 0,98879$
7	$I_{DMT1}(t) = 1,04553 \cdot e^{-0,01042 \cdot t}$ $R^2 = 0,92779$	$I_{DMT1}(t) = 0,21196 \cdot e^{-0,00996 \cdot t} + 0,82747 \cdot e^{-0,00996 \cdot t}$ $R^2 = 0,92874$	$I_{DMT1}(t) = 1,32791 \cdot e^{-0,03037 \cdot t} + 2,14886 \cdot e^{-0,03050 \cdot t} - 2,47858 \cdot e^{-0,04394 \cdot t}$ $R^2 = 0,99960$
	$I_{FPN}(t) = 1,03981 \cdot e^{-0,01142 \cdot t}$ $R^2 = 0,92944$	$I_{FPN}(t) = +0,73877 \cdot e^{-0,01088 \cdot t} + 0,29487 \cdot e^{-0,01088 \cdot t}$ $R^2 = 0,93042$	$I_{FPN}(t) = 1,25922 \cdot e^{-0,06466 \cdot t} + 1,85963 \cdot e^{-0,02523 \cdot t} - 2,12155 \cdot e^{-0,06084 \cdot t}$ $R^2 = 0,98084$

Tabla 3.6. Curvas multi-exponenciales que predicen el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP para cada célula Caco-2 estudiada, cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM.

Célula N°	Función Mono-Exponencial	Función Bi-Exponencial	Función Tri-Exponencial
1	$I_{DMT1}(t) = 0,94922 \cdot e^{-0,00865 \cdot t}$ $R^2 = 0,96358$	$I_{DMT1}(t) = 0,08486 \cdot e^{-0,30090 \cdot t} + 0,91623 \cdot e^{-0,00745 \cdot t}$ $R^2 = 0,99414$	$I_{DMT1}(t) = 4,62914 \cdot e^{-0,01453 \cdot t} + 0,23408 \cdot e^{-0,11797 \cdot t} - 3,86324 \cdot e^{-0,01694 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 0,94528 \cdot e^{-0,00870 \cdot t}$ $R^2 = 0,95133$	$I_{FPN}(t) = 0,88276 \cdot e^{-0,00644 \cdot t} + 0,12020 \cdot e^{-0,17438 \cdot t}$ $R^2 = 0,99066$	$I_{FPN}(t) = 8,04183 \cdot e^{-0,01074 \cdot t} + 0,22427 \cdot e^{-0,11646 \cdot t} - 7,26166 \cdot e^{-0,01189 \cdot t}$ $R^2 = 0,99226$
2	$I_{DMT1}(t) = 0,88064 \cdot e^{-0,00906 \cdot t}$ $R^2 = 0,87454$	$I_{DMT1}(t) = 0,16298 \cdot e^{-0,48321 \cdot t} + 0,83832 \cdot e^{-0,00737 \cdot t}$ $R^2 = 0,99821$	$I_{DMT1}(t) = 0,16353 \cdot e^{-0,66863 \cdot t} + 11,94716 \cdot e^{-0,00390 \cdot t} - 11,11037 \cdot e^{-0,00365 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 0,92808 \cdot e^{-0,01237 \cdot t}$ $R^2 = 0,96566$	$I_{FPN}(t) = 0,90773 \cdot e^{-0,01162 \cdot t} + 0,09227 \cdot e^{-1,63913 \cdot t}$ $R^2 = 0,99591$	$I_{FPN}(t) = 2,39181 \cdot e^{-2,56256 \cdot t} - 2,29945 \cdot e^{-3,21124 \cdot t} + 0,90763 \cdot e^{-0,01161 \cdot t}$ $R^2 = 0,99592$
3	$I_{DMT1}(t) = 0,88279 \cdot e^{-0,01395 \cdot t}$ $R^2 = 0,92275$	$I_{DMT1}(t) = 0,80585 \cdot e^{-0,01088 \cdot t} + 0,19691 \cdot e^{-0,27657 \cdot t}$ $R^2 = 0,99577$	$I_{DMT1}(t) = -32,50797 \cdot e^{-0,04771 \cdot t} + 2,73660 \cdot e^{-0,08968 \cdot t} + 30,77141 \cdot e^{-0,04419 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 0,94686 \cdot e^{-0,01409 \cdot t}$ $R^2 = 0,95554$	$I_{FPN}(t) = 0,91786 \cdot e^{-0,01277 \cdot t} + 0,08293 \cdot e^{-0,69199 \cdot t}$ $R^2 = 0,97314$	$I_{FPN}(t) = -7,60056 \cdot e^{-0,08187 \cdot t} + 5,52543 \cdot e^{-0,10125 \cdot t} + 3,07761 \cdot e^{-0,03653 \cdot t}$ $R^2 = 0,99664$
4	$I_{DMT1}(t) = 1,02319 \cdot e^{-0,01470 \cdot t}$ $R^2 = 0,97559$	$I_{DMT1}(t) = -20,63806 \cdot e^{-0,03217 \cdot t} + 21,61058 \cdot e^{-0,03098 \cdot t}$ $R^2 = 0,99137$	$I_{DMT1}(t) = -0,27579 \cdot e^{-0,20286 \cdot t} + 0,15996 \cdot e^{-3,31396 \cdot t} + 1,11583 \cdot e^{-0,01728 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,03782 \cdot e^{-0,00645 \cdot t}$ $R^2 = 0,95708$	$I_{FPN}(t) = -0,09574 \cdot e^{-0,12794 \cdot t} + 1,09446 \cdot e^{-0,00798 \cdot t}$ $R^2 = 0,98665$	$I_{FPN}(t) = -0,45426 \cdot e^{-0,63124 \cdot t} + 0,38746 \cdot e^{-1,08762 \cdot t} + 1,06667 \cdot e^{-0,00731 \cdot t}$ $R^2 = 0,99312$
5	$I_{DMT1}(t) = 1,08124 \cdot e^{-0,01412 \cdot t}$ $R^2 = 0,85236$	$I_{DMT1}(t) = 58,88775 \cdot e^{-0,03866 \cdot t} - 57,94104 \cdot e^{-0,03948 \cdot t}$ $R^2 = 0,96264$	$I_{DMT1}(t) = 11,83024 \cdot e^{-0,09465 \cdot t} - 27,87038 \cdot e^{-0,07352 \cdot t} + 17,04619 \cdot e^{-0,05636 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,07575 \cdot e^{-0,02013 \cdot t}$ $R^2 = 0,95121$	$I_{FPN}(t) = 1,33708 \cdot e^{-0,00206 \cdot t} - 0,35506 \cdot e^{-0,01918 \cdot t}$ $R^2 = 0,99501$	$I_{FPN}(t) = 0,03393 \cdot e^{-0,99988 \cdot t} + 7,88330 \cdot e^{-0,00665 \cdot t} - 6,91689 \cdot e^{-0,00876 \cdot t}$ $R^2 = 0,99605$
6	$I_{DMT1}(t) = 1,06170 \cdot e^{-0,00483 \cdot t}$ $R^2 = 0,71021$	$I_{DMT1}(t) = -29,97842 \cdot e^{-0,02655 \cdot t} + 30,95635 \cdot e^{-0,02537 \cdot t}$ $R^2 = 0,98262$	$I_{DMT1}(t) = 0,06796 \cdot e^{-0,68217 \cdot t} - 2,28546 \cdot e^{-0,03737 \cdot t} + 3,22088 \cdot e^{-0,12768 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,09649 \cdot e^{-0,00568 \cdot t}$ $R^2 = 0,62137$	$I_{FPN}(t) = 31,37472 \cdot e^{-0,02993 \cdot t} - 30,40705 \cdot e^{-0,03148 \cdot t}$ $R^2 = 0,95724$	$I_{FPN}(t) = 0,11861 \cdot e^{-0,56464 \cdot t} - 1,28195 \cdot e^{-0,05966 \cdot t} + 2,16586 \cdot e^{-0,02040 \cdot t}$ $R^2 = 0,97342$
7	$I_{DMT1}(t) = 1,00921 \cdot e^{-0,00438 \cdot t}$ $R^2 = 0,37151$	$I_{DMT1}(t) = 0,34496 \cdot e^{-0,00399 \cdot t} + 0,66015 \cdot e^{-0,00399 \cdot t}$ $R^2 = 0,37315$	$I_{DMT1}(t) = -7,85874 \cdot e^{-0,03656 \cdot t} + 8,58017 \cdot e^{-0,03497 \cdot t} + 0,27820 \cdot e^{-0,12768 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,05457 \cdot e^{-0,01109 \cdot t}$ $R^2 = 0,74718$	$I_{FPN}(t) = -51,89778 \cdot e^{-0,03050 \cdot t} + 52,85384 \cdot e^{-0,02987 \cdot t}$ $R^2 = 0,83148$	$I_{FPN}(t) = -0,01148 \cdot e^{-0,09438 \cdot t} + 0,59656 \cdot e^{-0,01652 \cdot t} + 0,42794 \cdot e^{-0,06157 \cdot t}$ $R^2 = 0,99055$

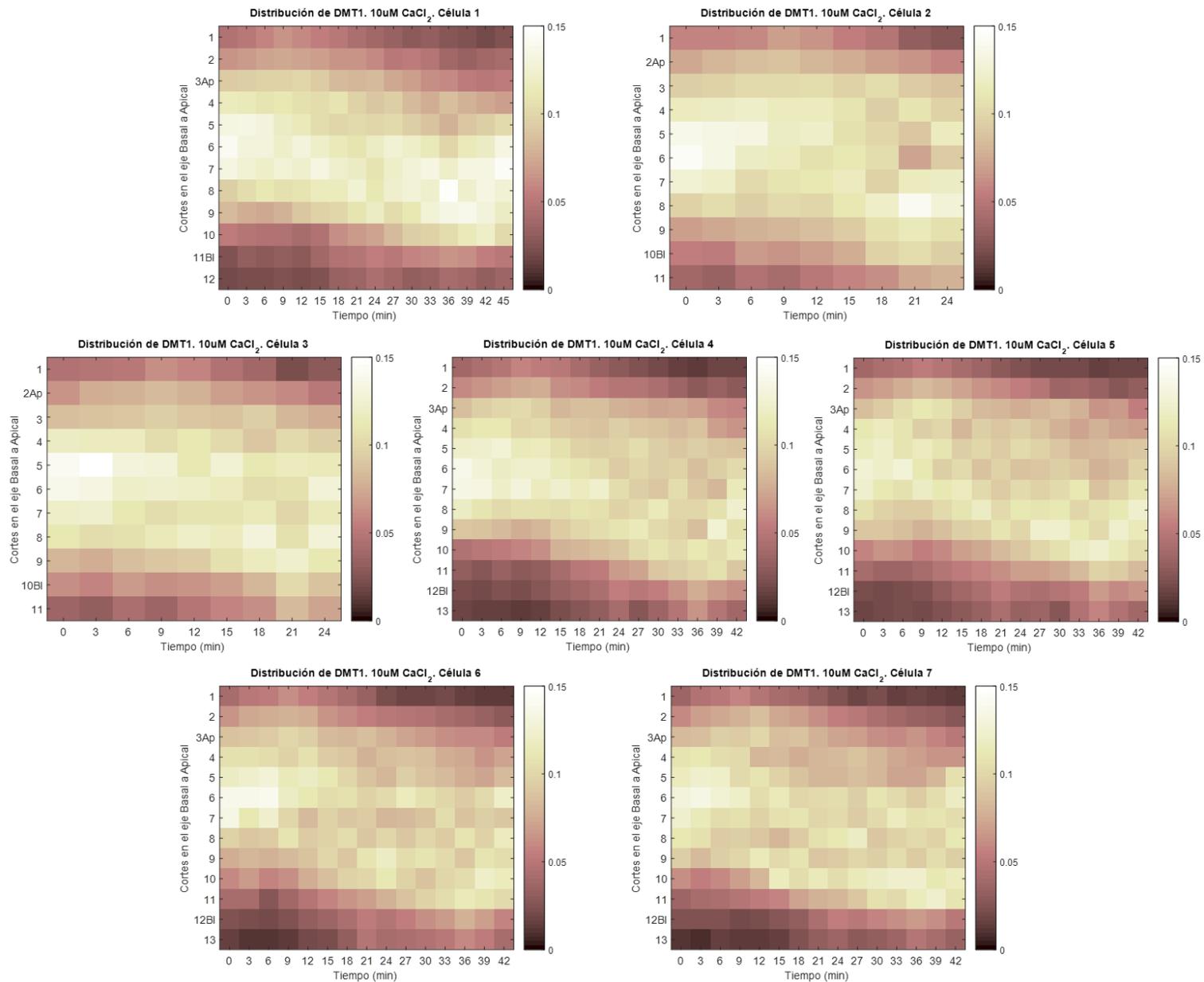


Figura 3.3. Relocalización en el tiempo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 . Eje “Cortes en el eje Basal a Apical” es el número de cortes ópticos de cada célula, donde “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “BI” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje, y la suma de la intensidad de fluorescencia de todos los cortes para cada instante de tiempo es 1.

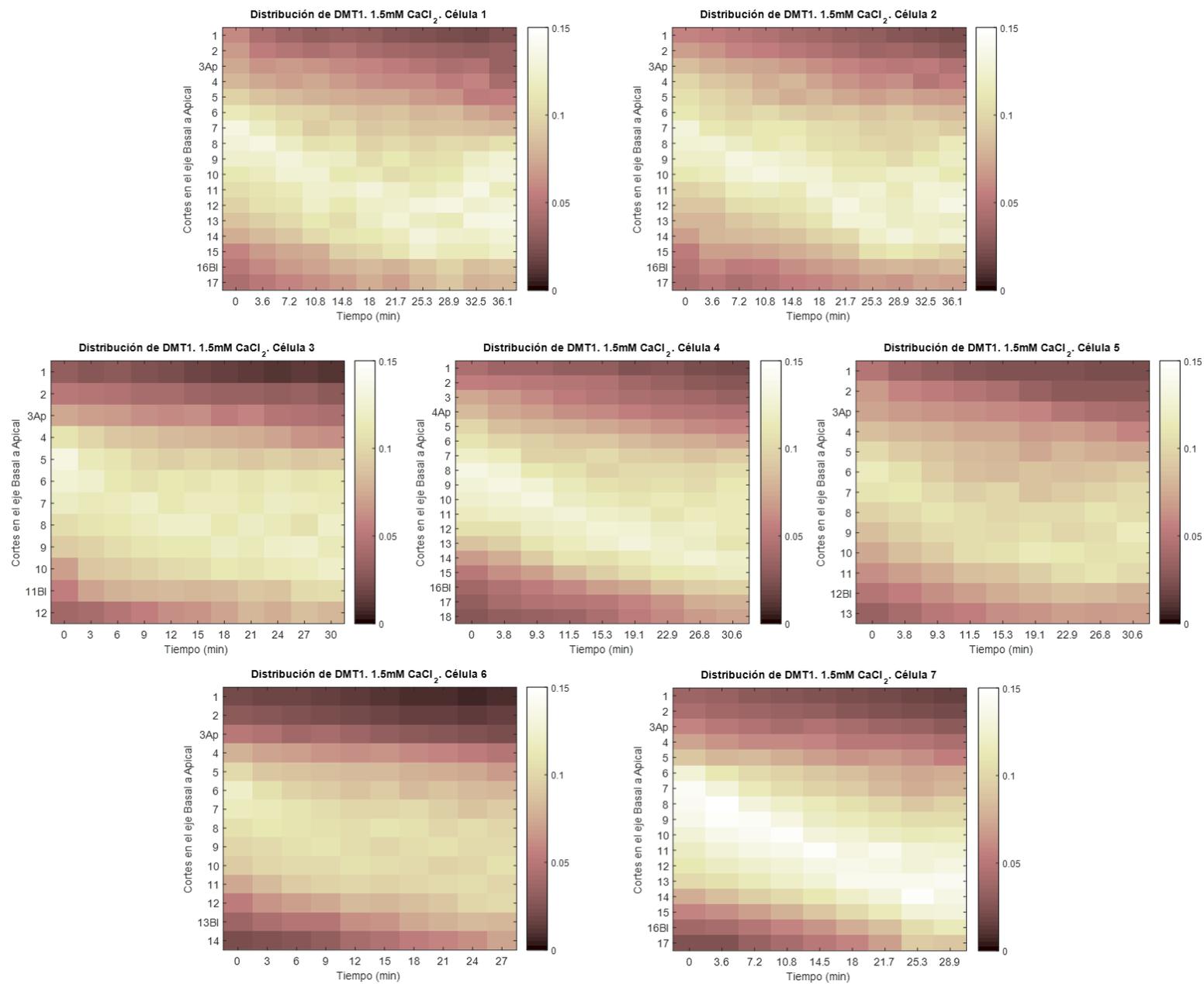


Figura 3.4. Relocalización en el tiempo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 1,5 *mM* de CaCl_2 . En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “BI” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje.

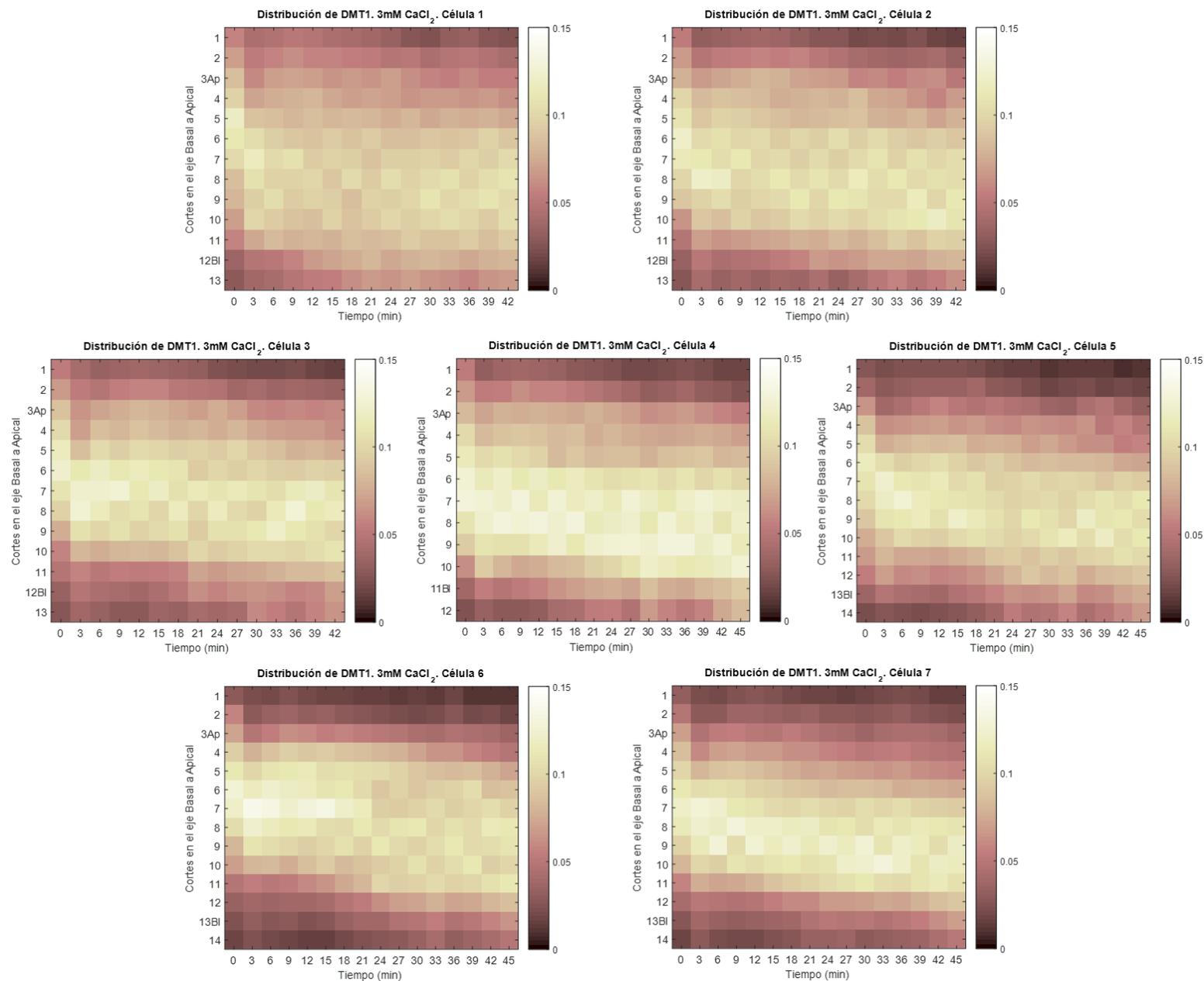


Figura 3.5. Relocalización en el tiempo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 3 mM de CaCl_2 . En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “BI” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje.

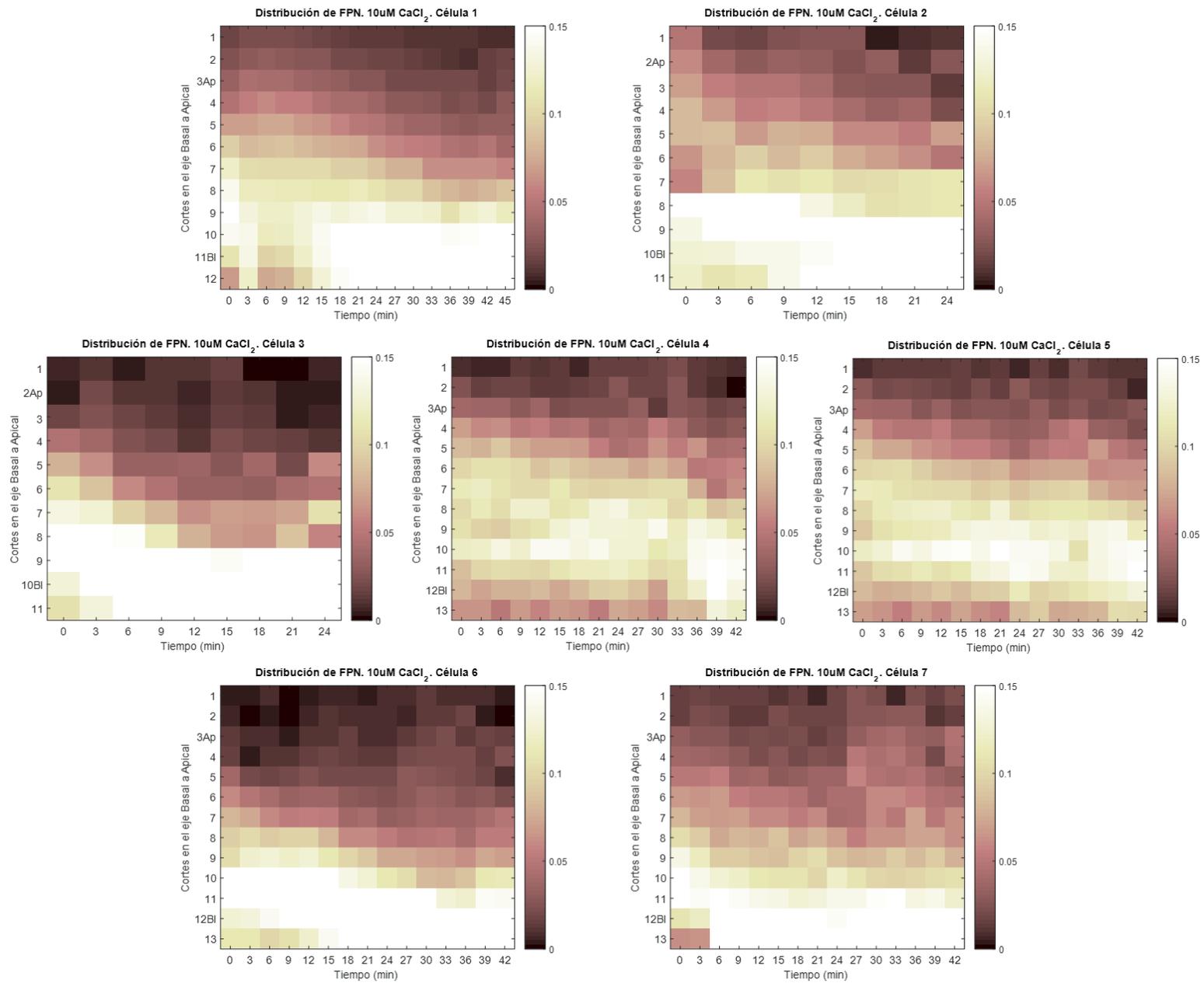


Figura 3.6. Relocalización en el tiempo de FPN-Tag-RFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 . En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje.

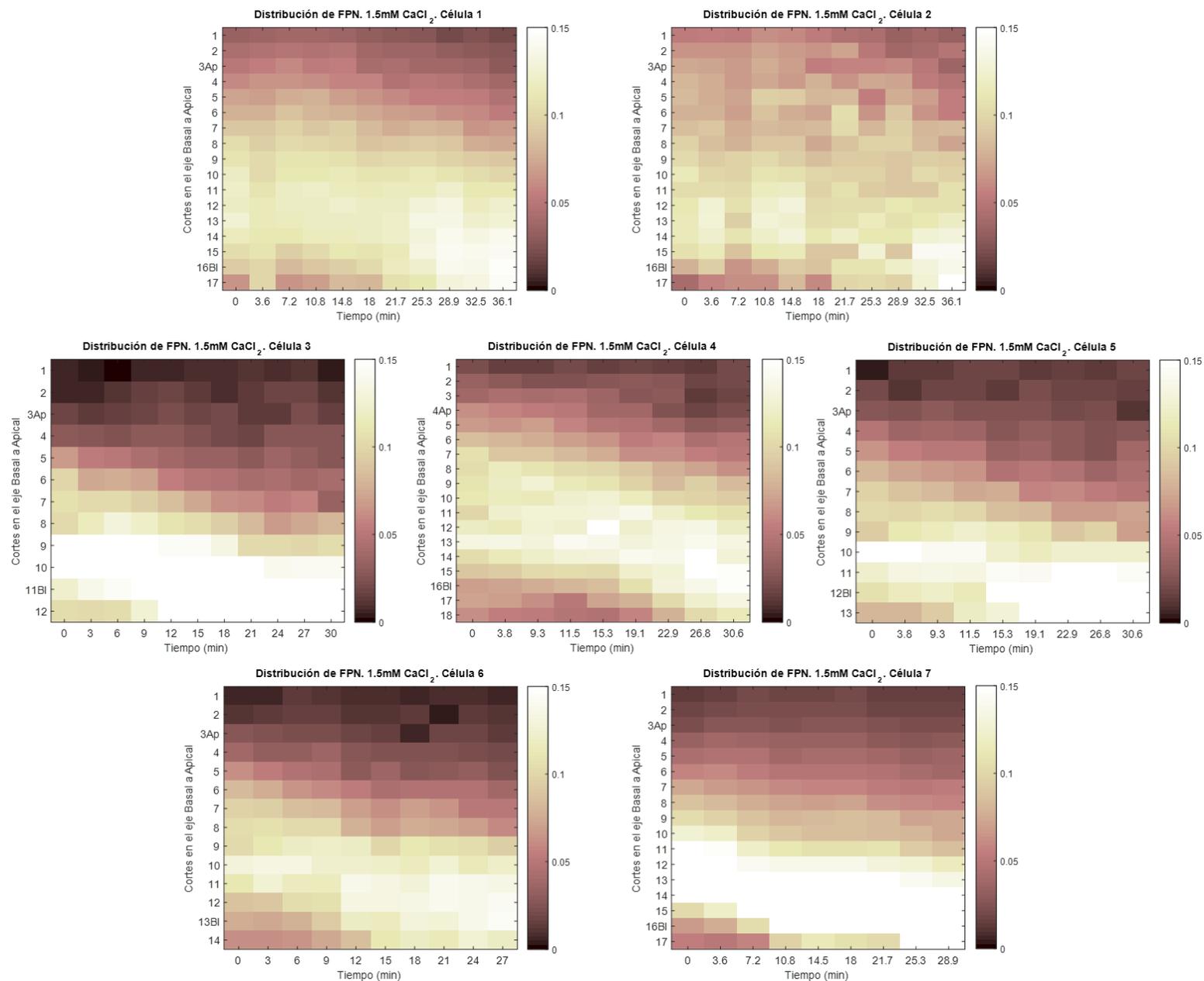


Figura 3.7. Relocalización en el tiempo de FPN-Tag-RFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 1,5 mM de CaCl₂. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje.

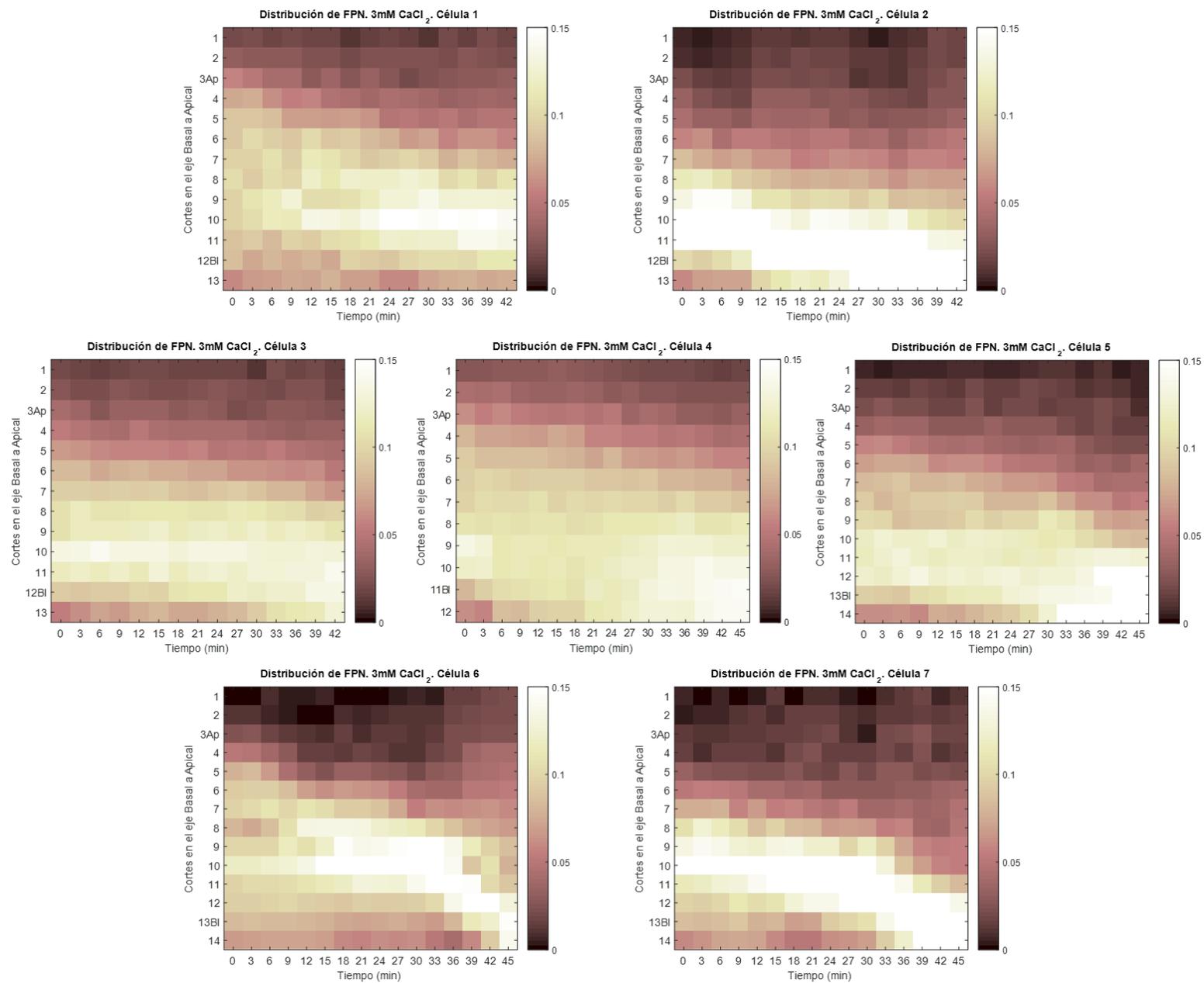


Figura 3.8. Relocalización en el tiempo de FPN-Tag-RFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 3 mM de CaCl₂. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje.

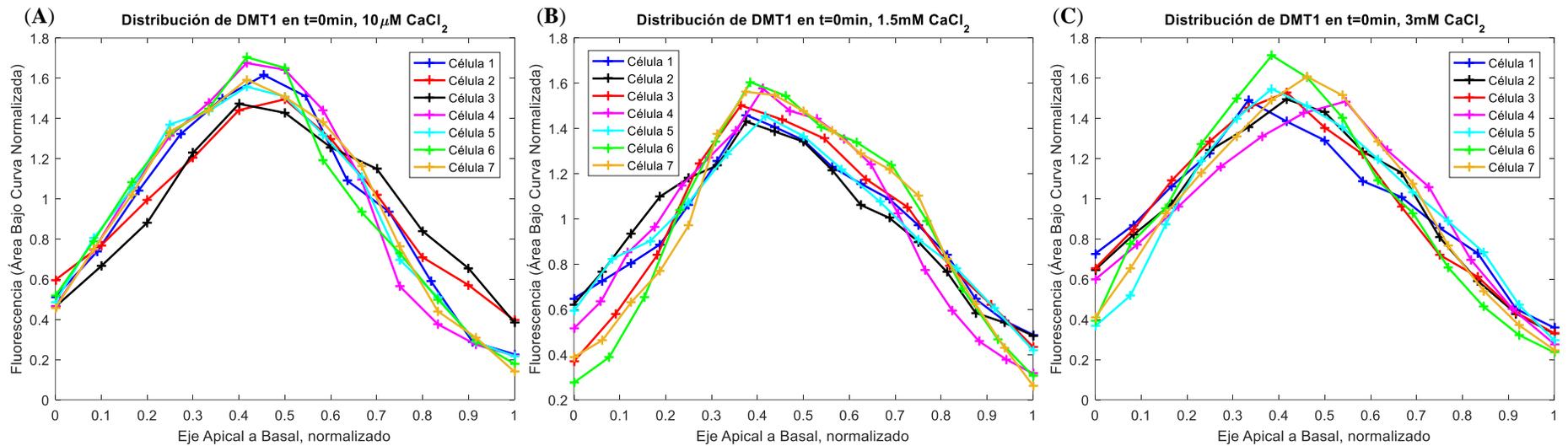


Figura 3.9. Perfil distribución de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal en el tiempo inicial, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 , (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 .

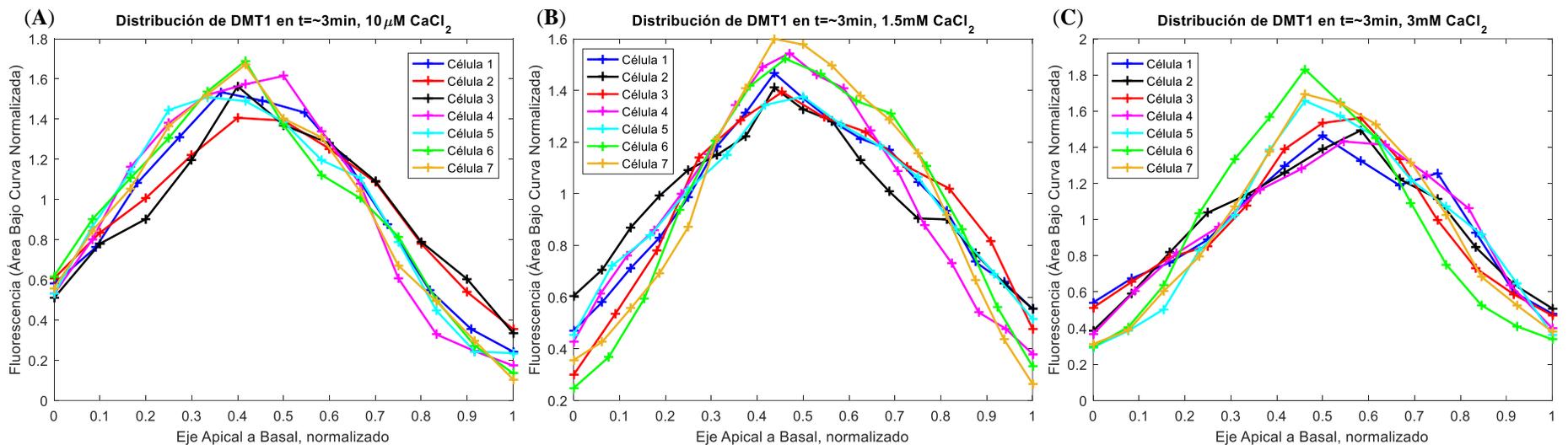


Figura 3.10. Perfil distribución de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal capturado para el instante de tiempo inmediatamente posterior a la adición del medio con la concentración de calcio a analizar, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 , (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 .

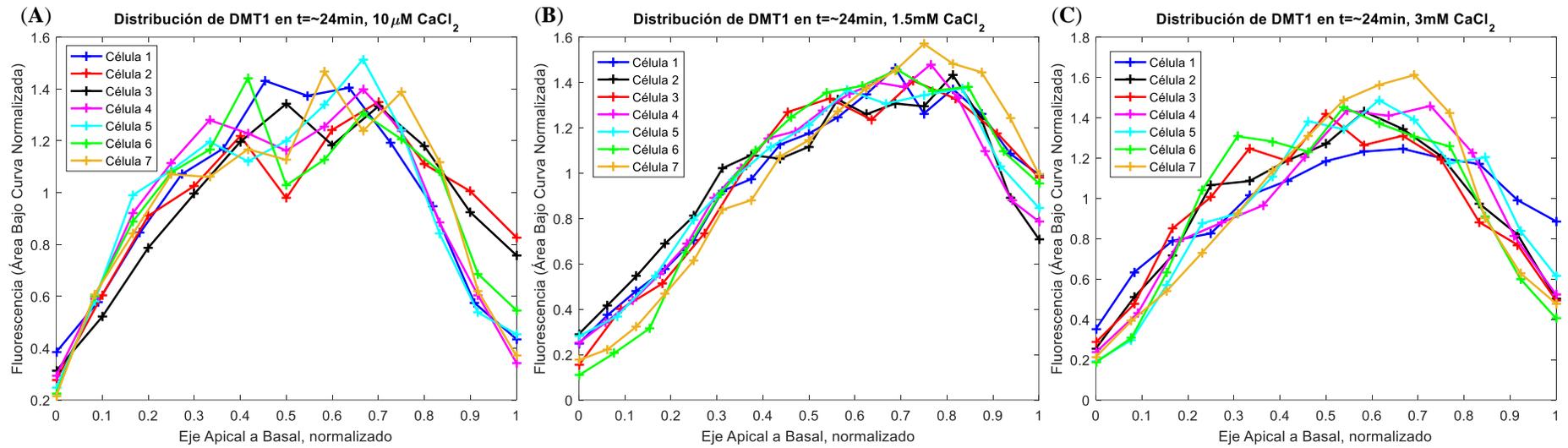


Figura 3.11. Perfil distribución de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal capturado en ~24 minutos, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 , (B) $1,5\ \text{mM}$ de CaCl_2 , y (C) $3\ \text{mM}$ de CaCl_2 .

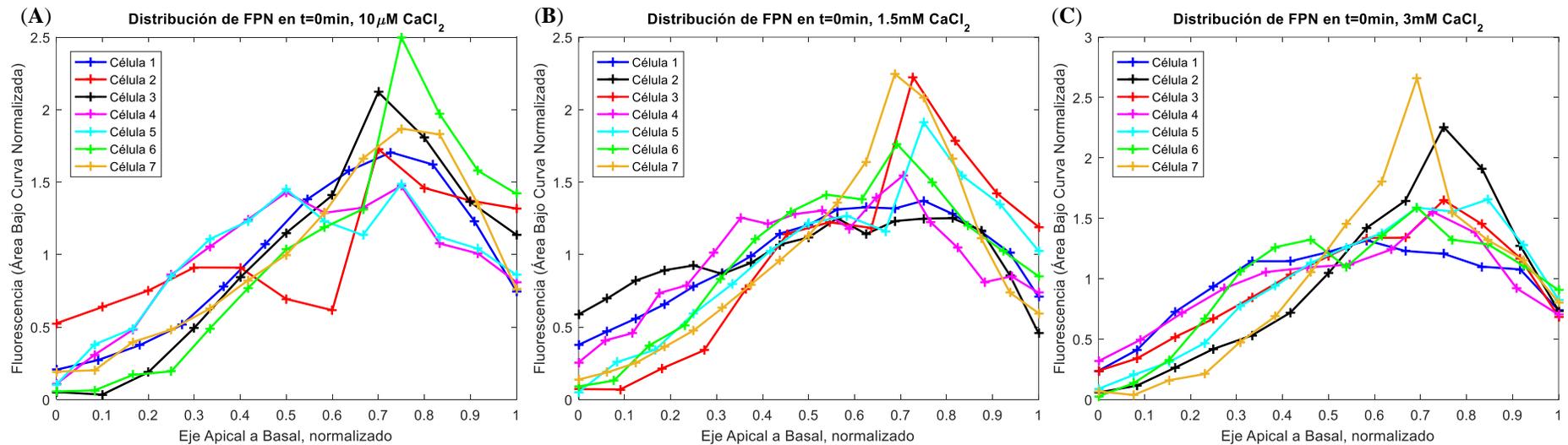


Figura 3.12. Perfil distribución de FPN-TagRFP entre los dominios apical–basal en el tiempo inicial, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 , (B) $1,5\ \text{mM}$ de CaCl_2 , y (C) $3\ \text{mM}$ de CaCl_2 .

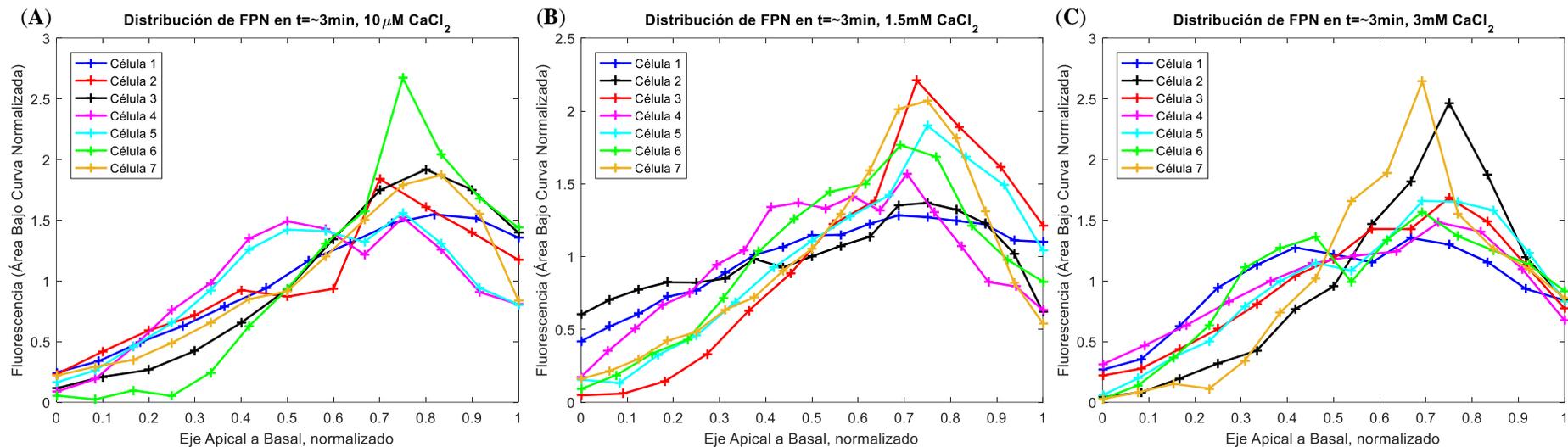


Figura 3.13. Perfil distribución de FPN-TagRFP entre los dominios apical–basal capturado para el instante de tiempo inmediatamente posterior a la adición del medio con la concentración de calcio a analizar, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 , (B) $1,5\ \text{mM}$ de CaCl_2 , y (C) $3\ \text{mM}$ de CaCl_2 .

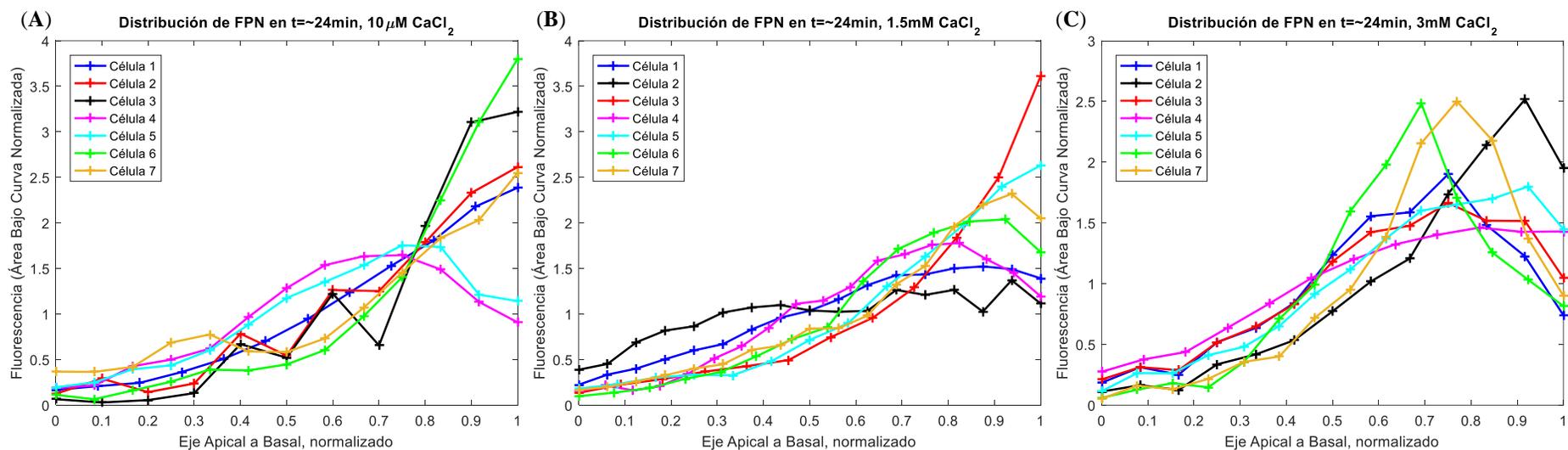


Figura 3.14. Perfil distribución de FPN-TagRFP entre los dominios apical–basal capturado en ~ 24 minutos, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 , (B) $1,5\ \text{mM}$ de CaCl_2 , y (C) $3\ \text{mM}$ de CaCl_2 .

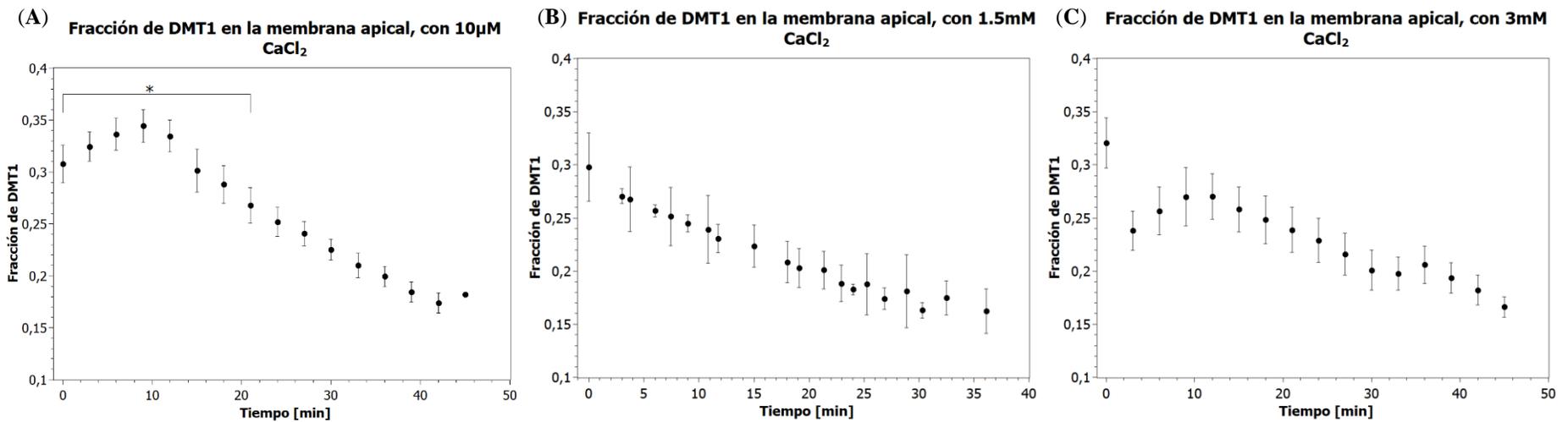


Figura 3.15. Fracción de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP en la membrana apical, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μ M de CaCl₂, * $p < 0,05$ (B) 1,5 mM de CaCl₂, y (C) 3 mM de CaCl₂. Los resultados experimentales se presentan como las medias \pm D.E. de 7 células.

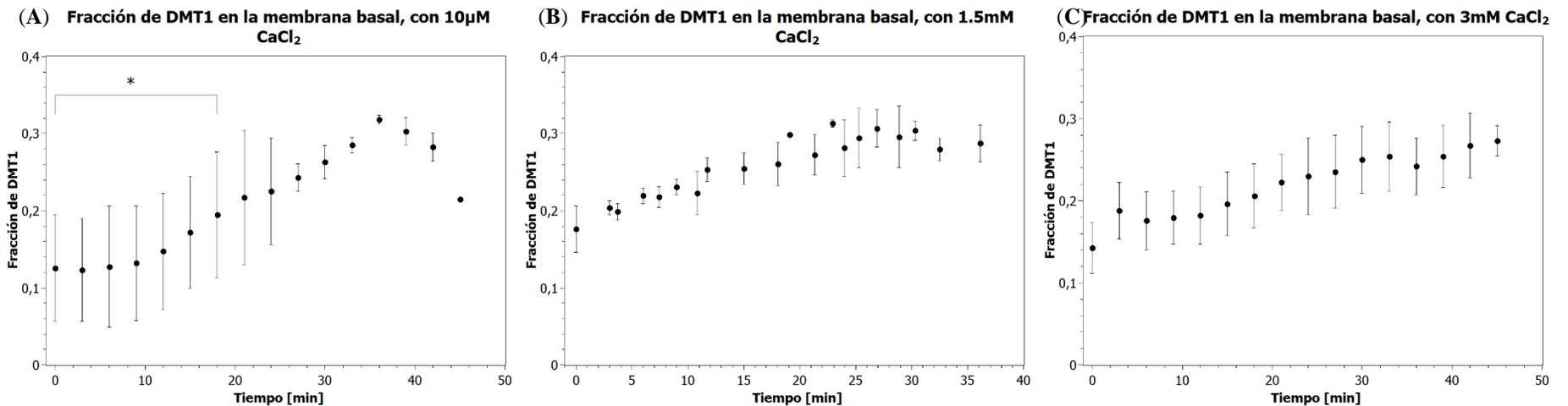


Figura 3.16. Fracción de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP en la membrana basal, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μ M de CaCl₂, * $p < 0,05$ (B) 1,5 mM de CaCl₂, y (C) 3 mM de CaCl₂. Los resultados experimentales se presentan como las medias \pm D.E. de 7 células.

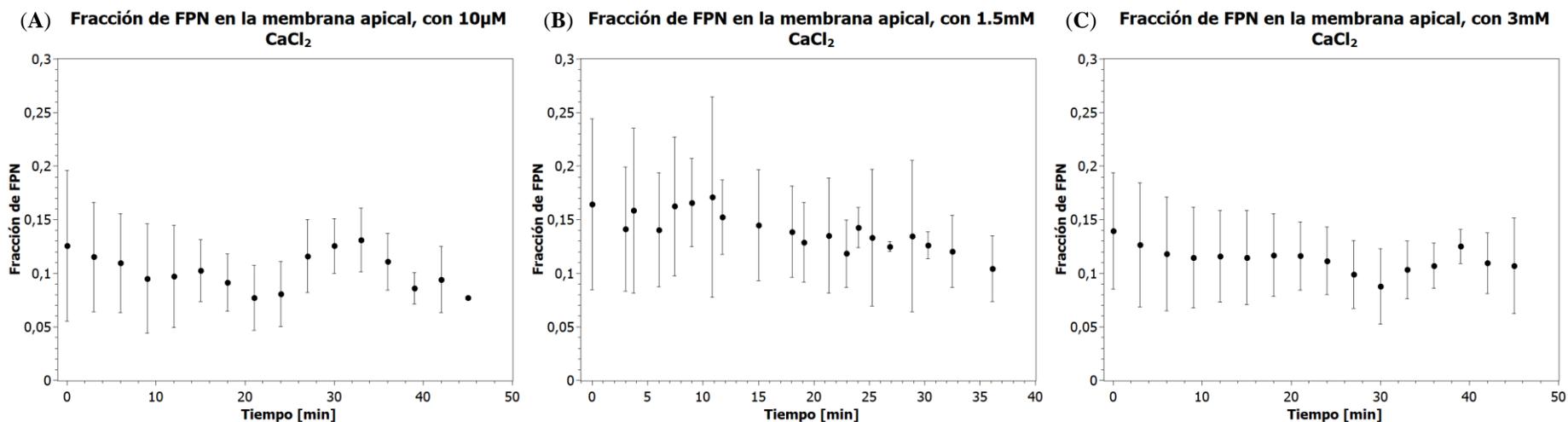


Figura 3.17. Fracción de FPN-TagRFP en la membrana apical, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μ M de CaCl_2 , (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 . Los resultados experimentales se presentan como las medias \pm D.E. de 7 células.

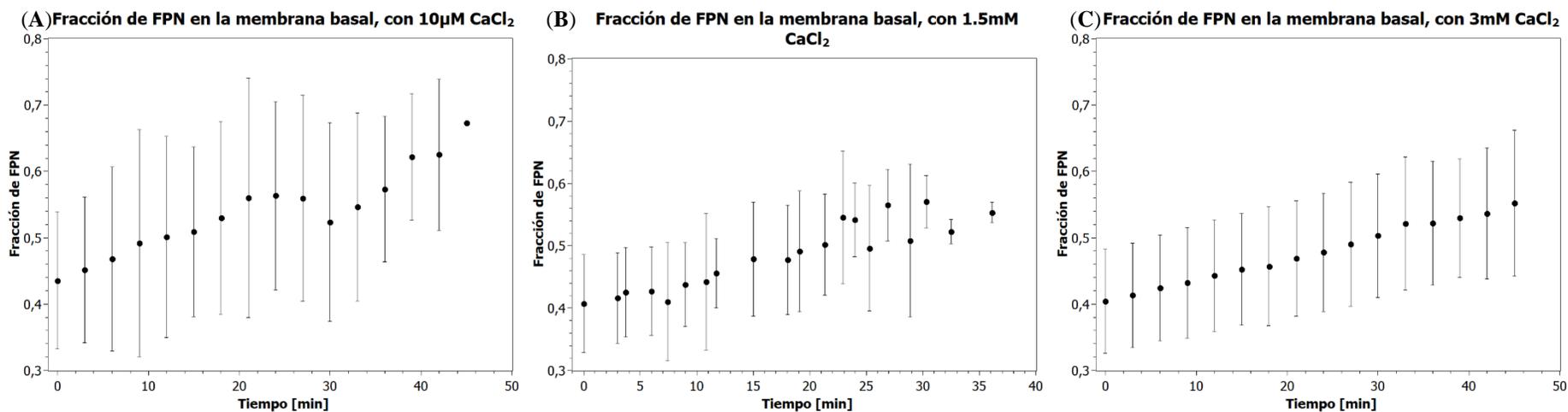


Figura 3.18. Fracción de FPN-TagRFP en la membrana basal, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μ M de CaCl_2 , (B) 1,5 mM de CaCl_2 , y (C) 3 mM de CaCl_2 . Los resultados experimentales se presentan como las medias \pm D.E. de 7 células.

3.3.1.1 Análisis del efecto del calcio extracelular en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, cuando el medio tiene una concentración de 10 μM de CaCl_2

En las células donde la concentración de calcio en el compartimiento apical disminuyó de 1,5 mM a 10 μM , se encontró un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de la concentración de DMT1 en la membrana apical observada inmediatamente luego del cambio de la concentración del medio a 10 μM CaCl_2 respecto a la concentración de DMT1 inicial en el dominio apical. En la [Figura 3.10\(A\)](#) se puede observar que el perfil de distribución de DMT1 se desplaza hacia la izquierda luego de reducir la concentración de calcio extracelular a 10 μM , en comparación con el perfil observado en la [Figura 3.9 \(A\)](#), lo cual representa el movimiento del transportador DMT1 desde el citosol hacia la membrana apical. Además, tanto en la [Figura 3.3](#) como en la [Figura 3.15\(A\)](#) se aprecia claramente que durante los primeros 9 minutos de observación, la concentración de DMT1 en los dominios apicales se incrementa para todas las células analizadas en aproximadamente 12 %, lo cual incrementaría la captación apical de hierro ante un desafío con este metal. Sin embargo, luego de estos 9 minutos, también se aprecia que los niveles de DMT1 apicales comienzan a disminuir en la membrana apical, y desde el minuto 21 de observación, la concentración de DMT1 apical es significativamente menor ($p < 0,05$) respecto a la obtenida al inicio del experimento. En la [Figura 3.11\(A\)](#) como en la [Figura 3.3](#) puede apreciarse que luego de 24 minutos de medición de la fluorescencia, DMT1 se relocaliza mayoritariamente hacia la zona central de cada célula estudiada. En el capítulo anterior se propuso que el Ca^{2+} se une a un sitio alostérico no catalítico de DMT1 que media la inhibición no competitiva del calcio para la captación de hierro; esto implica que, considerando las condiciones experimentales, la proporción de DMT1 unida a Ca^{2+} o a Fe^{2+} debería ser muy reducida. Por lo tanto, disminución de DMT1 apical observada luego de 21 minutos, puede deberse a un posible mecanismo para regular a la baja la absorción de hierro, tal como ocurre en la hemocromatosis hereditaria ([Nuñez y col., 2010](#)), que se ve acentuado por la mayor disponibilidad de DMT1 libre, pues se reduce el número de estos transportadores unidos a Ca^{2+} .

En relación con la concentración de DMT1 en la membrana basal cuando la concentración de calcio en el compartimiento apical disminuyó de 1,5 mM a 10 μM , es a partir del minuto 18 de observación donde se encuentra un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de la proporción de transportadores en los dominios basales, respecto a los detectados al inicio de las mediciones de fluorescencia, tal como se puede apreciar en la [Figura 3.16\(A\)](#) y la [Figura 3.3](#). Esto deja en evidencia que el cambio inmediato que produce la disminución de la concentración de calcio extracelular es la relocalización de DMT1 desde el citosol hacia los dominios apicales, lo cual explicaría el aumento de la captación de hierro observado en el capítulo anterior (ver [Figura 2.1](#)) cuando el medio extracelular tiene una concentración 10 μM CaCl_2 de junto con un desafío de hierro, ya que se dispondría de un mayor número de transportadores en la membrana apical. En el minuto 39 de observación, se encontró que la concentración de DMT1 en la membrana basal comienza a disminuir, lo cual implica un retorno de este transportador al citosol el cual a diferencia de los resultados presentados por [Nuñez y col. \(2010\)](#), no debería estar asociado a la captación basolateral de hierro por DMT1 (en nuestros experimentos nunca se añadió hierro en el medio basal), ni al transporte de hierro por DMT1 fuera de la vesícula endocítica durante la endocitosis de transferrina basolateral (en nuestros experimentos se utilizó medio libre de suero). Sin

embargo, este retorno de DMT1 no indujo un aumento significativo de la concentración de DMT1 apical hasta el minuto 45.

Respecto al efecto de disminuir la concentración de calcio extracelular en la relocalización de FPN, se encontró que esta disminución no produce cambios estadísticamente significativos en la concentración de FPN en la membrana apical durante todo el tiempo de observación, lo cual se hace evidente al observar la [Figura 3.17\(A\)](#) y la [Figura 3.6](#). Además, observó que la proporción de FPN en la membrana basal aumenta de manera significativa ($p < 0,05$), respecto a la proporción detectada al inicio de las mediciones de fluorescencia, a partir del minuto 36 de observación, lo cual se puede observar en la [Figura 3.18\(A\)](#) y en los perfiles de distribución de FPN mostrados en las [Figuras 3.12\(A\)](#), [3.13\(A\)](#) y [3.14\(A\)](#), lo que debería permitir un mayor flujo de salida de hierro desde la membrana basolateral.

Por lo tanto, la disminución de la concentración de calcio extracelular de $1,5 \text{ mM}$ a $10 \mu\text{M}$, sólo indujo cambios significativos en la distribución de DMT1 en la membrana apical. Esto refuerza la idea reportada en el capítulo anterior de este manuscrito de que el efecto inhibitorio del calcio sobre DMT1 durante el proceso de captación de hierro es un efecto verdaderamente extracelular, ya que sólo la relocalización de este transportador y no de FPN se vio afectada. La relocalización de DMT1 hacia los dominios apicales al reducir la concentración de calcio del medio extracelular debería ayudar a facilitar el transporte de hierro a través de la célula si estas se exponen posteriormente a hierro en la cámara apical.

3.3.1.2 Análisis del efecto del calcio extracelular en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, cuando el medio tiene una concentración de $1,5 \text{ mM}$ de CaCl_2

Cuando la concentración de calcio en el compartimiento apical se mantuvo en $1,5 \text{ mM}$, no se produjeron cambios estadísticamente significativos en la concentración de FPN en la membrana apical, como puede deducirse al analizar la fracción de FPN en la membrana apical mostrada en la [Figura 3.17\(B\)](#), y la relocalización en el tiempo de FPN mostrada en las [Figura 3.7](#). Por otro lado, los niveles de FPN en la membrana basal aumentan de manera significativa ($p < 0,05$), respecto a la proporción detectada al inicio de las observaciones, a partir del minuto 21 de observación, como se evidencia en la [Figura 3.18\(B\)](#) y también comparando el perfil de distribución de FPN inicial ([Figura 3.12\(B\)](#)) respecto al perfil obtenido luego de 24 minutos de medición de fluorescencia ([Figura 3.14\(B\)](#)).

En relación con la concentración de DMT1, tal como se puede apreciar en la [Figura 3.4](#) y en la [Figura 3.16\(B\)](#), se encontró un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de $\sim 15 \%$ de la concentración de DMT1 en la membrana basal respecto a la concentración de DMT1 inicial basal, inmediatamente luego del cambio del medio MEM con $1,5 \text{ mM}$ CaCl_2 y 2% de SBF, a medio MEM con $1,5 \text{ mM}$ CaCl_2 . También se encontró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de $\sim 9 \%$ de la concentración de DMT1 en la membrana apical inmediatamente luego de dicho cambio de medio. Tanto en la [Figura 3.4](#) como en la [Figura 3.15\(B\)](#) se aprecia que, desde el inicio de las observaciones, los niveles de DMT1 en los dominios apicales disminuyen para todas las células analizadas. Además, en la [Figura 3.10\(B\)](#) y [Figura 3.11\(B\)](#) se puede observar que el perfil de distribución de DMT1 se desplaza hacia el dominio basal (hacia la derecha) luego del cambio del medio en el compartimiento apical, en comparación con el perfil observado en la [Figura 3.9 \(B\)](#). Estas relocalizaciones de DMT1 apical y basal no tienen sentido de inmediato, ya que la concentración de calcio del medio extracelular se mantuvo igual a $1,5 \text{ mM}$ CaCl_2 .

En el suero de los seres humanos y en el suero bovino fetal (SBF), la albúmina, una proteína transportadora, es la proteína más abundante, comprendiendo más de la mitad de la masa proteica sérica total (Shah, 1999; Even y col.; 2006; Hong y col., 2016; Geyer y col., 2017; Pisani y col., 2017). La fetuina, una proteína de respuesta de fase aguda, es otra proteína que también es abundante en el suero bovino fetal, al igual que su homóloga, la glicoproteína alfa 2-Heremans-Schmid (α 2HS) es abundante en el suero humano (Suzuki y col., 1994; Pisani y col., 2017). Tanto la albúmina y como la fetuina/ α 2HS del suero se unen competitivamente a los iones de calcio (Ca^{2+}), por lo que la concentración de calcio libre o iónico es menor que la concentración de calcio total en el suero (Tietz, 1995; Wrench y col., 1988; Anderson 2001). La unión del Ca^{2+} a la albúmina es un proceso complejo caracterizado por múltiples sitios de unión cuya afinidad y capacidad de unión son variables (Besarab y col., 1981); por otro lado, la actividad de unión de Ca^{2+} de la fetuina es mayor que la de la albúmina en el suero bovino fetal cuando este se recolecta en la etapa gestacional tardía (Suzuki y col., 1994). Además, se ha reportado que la transferrina, aunque es menos abundante en el suero humano y bovino en comparación con la albúmina o la fetuina/ α 2HS, también tiene la capacidad de unirse a un ion de calcio (Choi y col., 2012).

Los componentes de cualquier lote dado de SBF muestran variaciones según la dieta bovina, la época del año y los lugares de donde se recolectó el producto; sin embargo, la albúmina, la fetuina y la transferrina siempre son muy abundantes en el SBF (Pedraza y col., 2008). Por lo tanto, el SBF al ser rico en albúmina, y además contar con altas concentraciones de fetuina/ α 2HS y transferrina, aporta proteínas que actúan como agentes secuestrantes de Ca^{2+} libre (Suzuki y col., 1994), y un efecto indirecto de estas proteínas podría ser la disminución de la concentración de Ca^{2+} libre en el medio de cultivo, aunque la concentración de calcio total se mantenga constante (Pacheco y col., 1993).

Considerando que en estos experimentos la concentración de calcio extracelular se mantuvo en 1,5 mM, y que la única variación fue la eliminación del SBF (al 2 %), el efecto de internalización de DMT1 observado podría atribuirse a que, al eliminar el SBF, la concentración de Ca^{2+} libre extracelular disponible aumenta, aunque la concentración de calcio total se mantiene, ya que no estarían presentes proteínas del SBF que tamponen el calcio.

Por lo tanto, si la concentración de Ca^{2+} libre es menor de 1,5 mM cuando en el compartimiento apical está presente el medio MEM con 1,5 mM CaCl_2 y 2 % de SBF, debido a la presencia de proteínas del SBF que tienen la capacidad de unirse a un ion de calcio, al realizar el cambio del medio a MEM con 1,5 mM CaCl_2 sin SBF, la concentración de Ca^{2+} libre aumenta, y esto explicaría por qué se induce el movimiento de DMT1 hacia los dominios basales de las células.

3.3.1.3 Análisis del efecto del calcio extracelular en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, cuando el medio tiene una concentración de 3 mM de CaCl_2

En la membrana apical FPN disminuyó de manera no significativa (Figura 3.17(C)), y FPN en la membrana basal aumentó de manera no significativa hasta los 30 minutos de observación (Figura 3.18(C)). Estos cambios sutiles en la distribución de FPN al aumentar la concentración de calcio extracelular de 1,5 mM a 3 mM también se aprecian al analizar tanto la relocalización de FPN mostrada en la Figura 3.8, como los perfiles de distribución de FPN en diferentes instantes de tiempo (Figura 3.12(C), 3.13(C) y 3.14(C)).

El aumento de la concentración extracelular de calcio indujo un aumento significativo de DMT1 en los dominios del citoplasma basal de ~32 % (Figura 3.16(C)), debida a la

disminución drástica de DMT1 de la membrana apical de ~26 % (Figura 3.15(C)). Los niveles de DMT1 apicales sufren una gran disminución inmediatamente después del aumento de la concentración de calcio de 1,5 mM a 3 mM, para luego aumentar un poco, pero de forma no significativa entre los minutos 6 y 12 de observación, seguidos de una disminución de DMT1 apical, como se muestra en la Figura 3.15(C) y en la Figura 3.5. En el perfil de distribución de DMT1 mostrado en la Figura 3.10(C) se aprecia que la concentración de DMT1 se desplaza hacia los dominios basales para el instante de tiempo inmediatamente posterior al aumento del calcio extracelular, respecto al perfil inicial mostrado en la Figura 3.9(C), y en el minuto 24 de observación la concentración de DMT1 predomina en el citosol periférico a la membrana basal y en esta membrana (Figura 3.11(C)).

La velocidad de relocalización de DMT1 desde los dominios apicales muestra una dependencia evidente con la concentración de calcio en el medio extracelular, que es más acentuada al inicio de los experimentos. Para cada condición experimental representada en la Figura 3.15, los modelos lineales que aproximan la derivada temporal de las mediciones experimentales después del cambio en la concentración de calcio extracelular se obtuvieron a través del método de la secante (Allen e Isaacson, 1998), ajustando los dos primeros puntos de cada curva, y se presentan en la Tabla 3.7. La tasa de cambio obtenida cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μM de Ca^{2+} , es la única con pendiente positiva, lo que indica que en este caso DMT1 en lugar de internalizarse se relocaliza hacia los dominios apicales. Por otro lado, cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 o 3 mM de Ca^{2+} , la tasa de cambio obtenida cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM fue mayor (en valor absoluto) en comparación a la obtenida con 1,5 de Ca^{2+} , lo que indica que la tasa de internalización de DMT1 desde la membrana apical es mayor mientras mayor sea la concentración extracelular de Ca^{2+} .

Tabla 3.7. Modelos lineales de la internalización de DMT1 desde la membrana apical, debida a un cambio de la concentración de Ca^{2+} extracelular. Estos modelos se ajustan a los dos primeros datos de la fracción de DMT1 en la membrana apical (f) en el tiempo (t) dado en minutos.

10 μM Ca^{2+}	1,5 mM Ca^{2+}	3 mM Ca^{2+}
$f = +0,0056 \cdot t + 0,3076$	$f = -0,0092 \cdot t + 0,2980$	$f = -0,0275 \cdot t + 0,3205$

3.3.2 Efecto del calcio extracelular en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, cuando las células se desafían con 10 μM de FAS

Los resultados presentados en la sección anterior mostraron que el aumento de la concentración de Ca^{2+} extracelular produce la rápida relocalización de DMT1 a los dominios basales sin un efecto aparente en la relocalización de FPN. Estos resultados son compatibles con el efecto inhibitorio del calcio sobre la función de transporte de Fe^{2+} a través de la membrana apical al citoplasma por parte de DMT1, ya que mientras mayor es la concentración de calcio extracelular, mayor será la internalización de DMT1, disminuyendo así el número de estos transportadores disponibles en la membrana apical para transportar hierro. Además, el secuestro de DMT1 en el citosol y en los dominios basales de las células se mantiene en el tiempo, ya que no se observó un retorno de DMT1 al compartimiento apical. Por el contrario, la reducción de la concentración de calcio a la mínima necesaria por las células para continuar realizando sus procesos con normalidad, indujo la relocalización de DMT1 hacia los dominios apicales durante los primeros 10 minutos, aumentando durante este tiempo el número de transportadores disponibles para transportar Fe^{2+} .

En esta sección se investigó el efecto de un desafío de $10 \mu\text{M}$ de FAS en el compartimiento apical de las células Caco-2 polarizadas sobre el movimiento en tiempo real de los transportadores DMT1 y FPN entre las membranas apical y basal, cuando este desafío se realiza en un medio con una concentración de calcio de $10 \mu\text{M}$, $1,5 \text{ mM}$ o 3 mM CaCl_2 . Las células Caco-2 se cultivaron en insertos bicamerales, se transfectaron con los constructos pEGFP-C1-DMT1(1A/IRE(+)) y pTagRFP-C-FPN1 y un día antes de seguir el movimiento de estos transportadores con microscopía confocal, las células se incubaron en medio MEM bajo en hierro (2 % SBF). El TEER de cada inserto fue superior a $240 \Omega \cdot \text{cm}^2$ antes y después de la realización de los experimentos, lo que garantiza la funcionalidad de la monocapa de las células Caco-2 analizadas. Se estudiaron 6 células para cada concentración de calcio extracelular analizada con $10 \mu\text{M}$ de FAS. En las Tablas 3.8, 3.9 y 3.10 se resumen las principales características de cada una de estas células Caco-2. El movimiento de DMT1 y FPN se hizo utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM710, con cortes ópticos de $1,5 \mu\text{m}$.

Una vez realizada la medición de la fluorescencia de los transportadores DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP con microscopía confocal, para cada una de las 6 células Caco-2 analizadas en cada condición experimental, se dibujó el área que corresponde a la célula de interés para todos los cortes ópticos. Posteriormente, se seleccionaron ocho áreas (cuadrados) en las que nunca se encontrara ninguna célula, de forma tal que estas ocho zonas sólo correspondan a la fluorescencia base (*background*) del inserto.

Tabla 3.8. Características de la visualización de las proteínas DMT1-EGFP y FPN1-TagRFP en cada célula Caco-2, utilizando microscopio confocal, cuando la concentración de calcio extracelular era de $10 \mu\text{M}$ y las células se desafiaron con $10 \mu\text{M}$ de FAS.

Célula Caco-2 N°	N° de cortes ópticos en el eje basal-apical	Altura de la célula Caco-2	Tiempo de observación de un barrido en el eje basal-apical	Tiempo de observación total
1	14	$19,5 \mu\text{m}$	$4,04 \text{ min}$	$36,32 \text{ min}$
2	19	$27 \mu\text{m}$	3 min	36 min
3	14	$19,5 \mu\text{m}$	3 min	48 min
4	14	$19,5 \mu\text{m}$	3 min	48 min
5	14	$19,5 \mu\text{m}$	3 min	45 min
6	14	$19,5 \mu\text{m}$	3 min	45 min

Tabla 3.9. Características de la visualización de las proteínas DMT1-EGFP y FPN1-TagRFP en cada célula Caco-2, utilizando microscopio confocal, cuando la concentración de calcio extracelular era de $1,5 \text{ mM}$ y las células se desafiaron con $10 \mu\text{M}$ de FAS.

Célula Caco-2 N°	N° de cortes ópticos en el eje basal-apical	Altura de la célula Caco-2	Tiempo de observación de un barrido en el eje basal-apical	Tiempo de observación total
1	10	$13,5 \mu\text{m}$	$3,40 \text{ min}$	$30,61 \text{ min}$
2	10	$13,5 \mu\text{m}$	$3,40 \text{ min}$	$30,61 \text{ min}$
3	12	$16,5 \mu\text{m}$	$5,52 \text{ min}$	$33,11 \text{ min}$
4	22	$31,5 \mu\text{m}$	$5,52 \text{ min}$	$33,11 \text{ min}$
5	20	$28,5 \mu\text{m}$	$4,25 \text{ min}$	$29,75 \text{ min}$
6	20	$28,5 \mu\text{m}$	$4,25 \text{ min}$	$29,75 \text{ min}$

Tabla 3.10. Características de la visualización de las proteínas DMT1-EGFP y FPN1-TagRFP en cada célula Caco-2, utilizando microscopio confocal, cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM y las células se desafiaron con 10 μM de FAS.

Célula Caco-2 N°	N° de cortes ópticos en el eje basal-apical	Altura de la célula Caco-2	Tiempo de observación de un barrido en el eje basal-apical	Tiempo de observación total
1	10	13,5 μm	3 min	36 min
2	10	13,5 μm	3 min	36 min
3	13	18 μm	3 min	39 min
4	13	18 μm	3 min	39 min
5	17	24 μm	3,61 min	36,13 min
6	8	10,5 μm	3 min	33 min

En la **Figura 3.19** se muestran las áreas seleccionadas para la Célula Caco-2 número 1 observada cuando la concentración de calcio extracelular analizada era de 10 μM Ca²⁺ junto con un desafío de 10 μM de FAS. La selección de las áreas para el resto de las células se encuentra en las secciones A.3.4, A.3.5 y A.3.6 de Anexos.

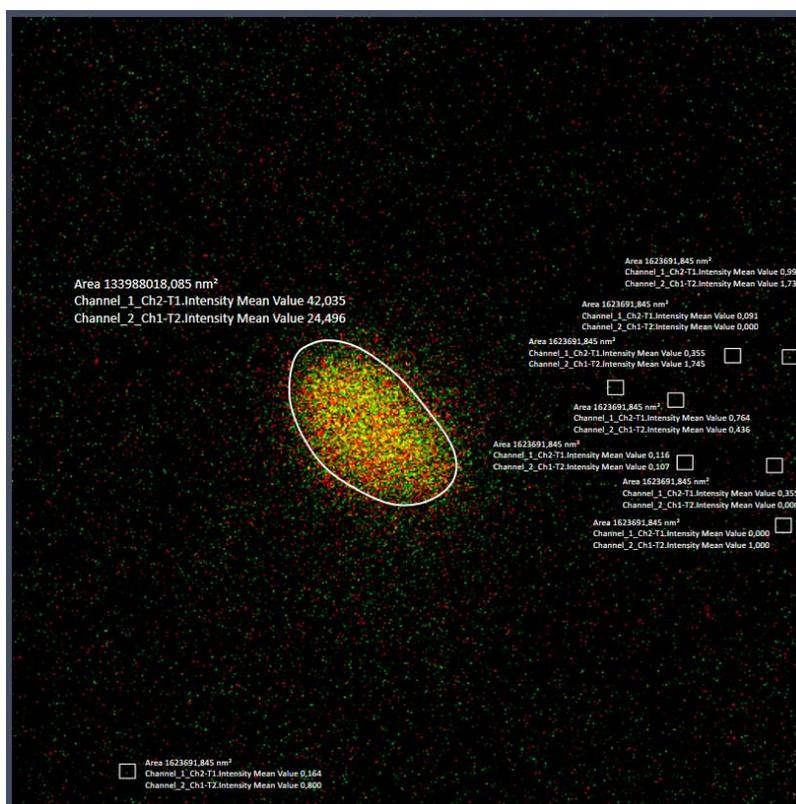


Figura 3.19. Selección del área correspondiente a la célula Caco-2 # 1 analizada cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μM, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

Obtenidas las mediciones de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP, para cada célula se obtuvo el promedio de la fluorescencia base de cada sonda fluorescente usada, y este promedio se le restó a la medición de fluorescencia del transportador respectivo en la célula, para obtener así la fluorescencia correspondiente netamente a la proteína transportadora de interés. Luego, se realizó la corrección de fotoblanqueo calculando para cada proteína en cada célula observada funciones mono, bi y tri-exponenciales que representaran el decaimiento de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y de FPN1-TagRFP. Estas funciones se presentan en las [Tablas 3.11, 3.12 y 3.13](#).

Tal como ocurrió en la sección anterior, analizando el coeficiente de determinación (R^2) se encontró que, en alrededor de la mitad de los casos, las funciones mono y bi-exponenciales no brindan un buen ajuste del decaimiento de la fluorescencia de los transportadores; en cambio las funciones tri-exponenciales proporcionan un ajuste satisfactorio. Por lo tanto, en esta sección también se utilizaron las funciones tri-exponenciales para ajustar el decaimiento de las fluorescencias de DMT1-EGFP y FPN-TagRFP para todas las células estudiadas. La corrección del fotoblanqueo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN-TagRFP se obtuvo dividiendo la fluorescencia original de estas sondas en cada instante de tiempo muestreado, entre el valor predicho por la función tri-exponencial en ese tiempo, como se indicó en la Ecuación 3.5.

La distribución de DMT1 y FPN entre los dominios apical–basal de cada célula Caco-2 estudiada durante el tiempo de observación se presenta en las [Figuras 3.20 – 3.25](#).

Los perfiles de distribución de DMT1 y de FPN a lo largo del eje basal–apical se graficaron para tres lecturas completas de la fluorescencia de las células: (i) la inicial, (ii) la inmediatamente posterior a la adición del medio con la concentración de calcio a analizar, y (iii) la correspondiente a la lectura obtenida aproximadamente a los 30 minutos de observación, que corresponde con el tiempo de observación total más corto obtenido (células 1 y 2 de la [Tabla 3.9](#)). Los perfiles de distribución tanto para DMT1 como para FPN se muestran en las [Figuras 3.26 – 3.31](#).

La variación de las fracciones de DMT1 y FPN en las membranas apical y basal, luego de desafiar a las células $10 \mu M$ de FAS en presencia de alguna de las tres concentraciones de calcio analizadas, se muestran en las [Figuras 3.32 – 3.35](#).

3.3.2.1 Análisis del efecto de un desafío de $10 \mu M$ de FAS en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, realizado cuando el medio del cultivo tiene una concentración final de calcio de $10 \mu M$ de $CaCl_2$

Los experimentos realizados revelan que cuando las células Caco-2 polarizadas se exponen a $10 \mu M$ de FAS en la cámara apical junto con $10 \mu M$ de $CaCl_2$, aproximadamente el 50 % del DMT1 presente en la membrana de ribete de del cepillo se internaliza dentro de los primeros 3 minutos de exposición, y luego los niveles de DMT1 en esta membrana se mantiene disminuyendo pero sin presentar cambios estadísticamente significativos, tal como se puede observar en la [Figura 3.32\(A\)](#) donde se presenta la fracción de DMT1 en la membrana apical para la condición experimental estudiada, y en la [Figura 3.20](#) que muestra la relocalización de DMT1 durante todo el tiempo de observación. Si para todas las células analizadas se compara el perfil de distribución inicial de DMT1 ([Figura 3.26\(A\)](#)) respecto al perfil luego desafiar a las células con hierro en un medio con $10 \mu M$ de $CaCl_2$ ([Figura 3.27\(A\)](#)), se aprecia claramente que las curvas se desplazan hacia el lado basal de la célula (hacia la derecha), lo que deja en evidencia nuevamente la rápida internalización del transportador ante estas condiciones experimentales.

Tabla 3.11. Curvas multi-exponenciales que predicen el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP para cada célula Caco-2 estudiada, cuando la concentración de calcio extracelular era de $10 \mu M$ y las células se desafiaron con $10 \mu M$ de FAS.

Célula N°	Función Mono-Exponencial	Función Bi-Exponencial	Función Tri-Exponencial
1	$I_{DMT1}(t) = 0,64285 \cdot e^{-0,04595 \cdot t}$ $R^2 = 0,77020$	$I_{DMT1}(t) = 0,51627 \cdot e^{-8,75602 \cdot t} + 0,48373 \cdot e^{-0,03371 \cdot t}$ $R^2 = 0,99762$	$I_{DMT1}(t) = 1,06274 \cdot e^{-0,00481 \cdot t} + 0,56596 \cdot e^{-1,00696 \cdot t} - 0,62871 \cdot e^{0,00572 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 0,69800 \cdot e^{-0,04655 \cdot t}$ $R^2 = 0,83240$	$I_{FPN}(t) = 0,44482 \cdot e^{-8,46902 \cdot t} + 0,55518 \cdot e^{-0,03672 \cdot t}$ $R^2 = 0,99815$	$I_{FPN}(t) = 1,99469 \cdot e^{-0,00357 \cdot t} + 0,52000 \cdot e^{-0,67163 \cdot t} - 1,51480 \cdot e^{0,00199 \cdot t}$ $R^2 = 0,99880$
2	$I_{DMT1}(t) = 0,72816 \cdot e^{-0,04348 \cdot t}$ $R^2 = 0,82666$	$I_{DMT1}(t) = 0,29931 \cdot e^{-0,01284 \cdot t} + 0,75587 \cdot e^{-0,16297 \cdot t}$ $R^2 = 0,94350$	$I_{DMT1}(t) = 76,74385 \cdot e^{-0,99438 \cdot t} - 76,23688 \cdot e^{-1,03544 \cdot t} + 0,49303 \cdot e^{-0,02835 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 0,91343 \cdot e^{-0,03157 \cdot t}$ $R^2 = 0,95796$	$I_{FPN}(t) = 0,77396 \cdot e^{-0,02526 \cdot t} + 0,24511 \cdot e^{-0,20100 \cdot t}$ $R^2 = 0,98366$	$I_{FPN}(t) = 0,26228 \cdot e^{-0,21019 \cdot t} + 1,11018 \cdot e^{-0,01702 \cdot t} - 0,35099 \cdot e^{-0,00477 \cdot t}$ $R^2 = 0,98425$
3	$I_{DMT1}(t) = 1,02412 \cdot e^{-0,02297 \cdot t}$ $R^2 = 0,97084$	$I_{DMT1}(t) = 38,07994 \cdot e^{-0,04019 \cdot t} - 37,13654 \cdot e^{-0,04094 \cdot t}$ $R^2 = 0,98581$	$I_{DMT1}(t) = 0,87382 \cdot e^{-0,21064 \cdot t} - 1,52521 \cdot e^{-0,11605 \cdot t} + 1,65038 \cdot e^{-0,03444 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,12905 \cdot e^{-0,02365 \cdot t}$ $R^2 = 0,96198$	$I_{FPN}(t) = 1,79195 \cdot e^{-0,03384 \cdot t} - 0,80127 \cdot e^{-0,07930 \cdot t}$ $R^2 = 0,99829$	$I_{FPN}(t) = -0,74390 \cdot e^{-0,17094 \cdot t} + 0,35740 \cdot e^{-0,28803 \cdot t} + 1,38568 \cdot e^{-0,02928 \cdot t}$ $R^2 = 0,99884$
4	$I_{DMT1}(t) = 1,05540 \cdot e^{-0,01849 \cdot t}$ $R^2 = 0,95853$	$I_{DMT1}(t) = 35,54592 \cdot e^{-0,03782 \cdot t} - 34,58794 \cdot e^{-0,03879 \cdot t}$ $R^2 = 0,99024$	$I_{DMT1}(t) = 1,34241 \cdot e^{-0,17322 \cdot t} - 1,95583 \cdot e^{-0,12205 \cdot t} + 1,61292 \cdot e^{-0,02880 \cdot t}$ $R^2 = 0,99988$
	$I_{FPN}(t) = 1,15664 \cdot e^{-0,02360 \cdot t}$ $R^2 = 0,94133$	$I_{FPN}(t) = 2,48635 \cdot e^{-0,03863 \cdot t} - 1,50143 \cdot e^{-0,06986 \cdot t}$ $R^2 = 0,99674$	$I_{FPN}(t) = -1,06191 \cdot e^{-0,18105 \cdot t} + 0,57690 \cdot e^{-0,29820 \cdot t} + 1,48513 \cdot e^{-0,03052 \cdot t}$ $R^2 = 0,99835$
5	$I_{DMT1}(t) = 0,91221 \cdot e^{-0,00343 \cdot t}$ $R^2 = 0,51511$	$I_{DMT1}(t) = 0,44361 \cdot e^{-0,05613 \cdot t} + 0,56557 \cdot e^{0,00791 \cdot t}$ $R^2 = 0,99602$	$I_{DMT1}(t) = 0,41514 \cdot e^{-0,06863 \cdot t} - 0,02966 \cdot e^{-7,55197 \cdot t} + 0,61453 \cdot e^{0,00650 \cdot t}$ $R^2 = 0,99994$
	$I_{FPN}(t) = 0,96804 \cdot e^{0,00354 \cdot t}$ $R^2 = 0,77079$	$I_{FPN}(t) = -3,04606 \cdot e^{0,00328 \cdot t} + 4,02650 \cdot e^{0,00328 \cdot t}$ $R^2 = 0,85442$	$I_{FPN}(t) = 0,97476 \cdot e^{0,00038 \cdot t} + 0,01191 \cdot e^{-22,56873 \cdot t} + 0,01246 \cdot e^{0,05984 \cdot t}$ $R^2 = 0,95967$
6	$I_{DMT1}(t) = 1,05236 \cdot e^{-0,00614 \cdot t}$ $R^2 = 0,89411$	$I_{DMT1}(t) = 0,69610 \cdot e^{-0,00572 \cdot t} + 0,35205 \cdot e^{-0,00572 \cdot t}$ $R^2 = 0,89567$	$I_{DMT1}(t) = 53,15322 \cdot e^{0,01197 \cdot t} - 0,01009 \cdot e^{-12,34585 \cdot t} - 52,14313 \cdot e^{0,01221 \cdot t}$ $R^2 = 0,99965$
	$I_{FPN}(t) = 1,17628 \cdot e^{0,00018 \cdot t}$ $R^2 = 0,00045$	$I_{FPN}(t) = -14,43413 \cdot e^{-0,03309 \cdot t} + 15,38358 \cdot e^{-0,02827 \cdot t}$ $R^2 = 0,88284$	$I_{FPN}(t) = -14,17259 \cdot e^{-0,09678 \cdot t} + 12,20901 \cdot e^{-0,10677 \cdot t} + 2,96865 \cdot e^{-0,02191 \cdot t}$ $R^2 = 0,93650$

Tabla 3.12. Curvas multi-exponenciales que predicen el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP para cada célula Caco-2 estudiada, cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM y las células se desafiaron con 10 μM de FAS.

Célula N°	Función Mono-Exponencial	Función Bi-Exponencial	Función Tri-Exponencial
1	$I_{DMT1}(t) = 1,06277 \cdot e^{-0,05048 \cdot t}$ $R^2 = 0,99403$	$I_{DMT1}(t) = 0,37574 \cdot e^{-0,04825 \cdot t} + 0,66239 \cdot e^{-0,04826 \cdot t}$ $R^2 = 0,99504$	$I_{DMT1}(t) = 1,12104 \cdot e^{-0,04713 \cdot t} - 0,07480 \cdot e^{-2,46142 \cdot t} - 0,04625 \cdot e^{-0,00125 \cdot t}$ $R^2 = 0,99969$
	$I_{FPN}(t) = 1,04352 \cdot e^{-0,04594 \cdot t}$ $R^2 = 0,96502$	$I_{FPN}(t) = -0,08729 \cdot e^{-9,21988 \cdot t} + 1,08729 \cdot e^{-0,04810 \cdot t}$ $R^2 = 0,97043$	$I_{FPN}(t) = 0,34526 \cdot e^{-0,01117 \cdot t} + 1,07133 \cdot e^{-0,10707 \cdot t} - 0,41749 \cdot e^{-0,32862 \cdot t}$ $R^2 = 0,97479$
2	$I_{DMT1}(t) = 1,08954 \cdot e^{-0,04531 \cdot t}$ $R^2 = 0,98240$	$I_{DMT1}(t) = 1,43249 \cdot e^{-0,02764 \cdot t} - 0,38439 \cdot e^{-0,00182 \cdot t}$ $R^2 = 0,98746$	$I_{DMT1}(t) = 1,16185 \cdot e^{-0,19383 \cdot t} - 1,08438 \cdot e^{-0,27128 \cdot t} + 0,92208 \cdot e^{-0,04005 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,01143 \cdot e^{-0,03696 \cdot t}$ $R^2 = 0,98337$	$I_{FPN}(t) = -0,01847 \cdot e^{-0,54247 \cdot t} + 1,01814 \cdot e^{-0,03713 \cdot t}$ $R^2 = 0,98366$	$I_{FPN}(t) = 2,68215 \cdot e^{-0,03737 \cdot t} - 1,65912 \cdot e^{-0,03740 \cdot t} - 0,02120 \cdot e^{-0,23945 \cdot t}$ $R^2 = 0,98356$
3	$I_{DMT1}(t) = 0,95233 \cdot e^{-0,01936 \cdot t}$ $R^2 = 0,95610$	$I_{DMT1}(t) = 0,45931 \cdot e^{0,00012 \cdot t} + 0,56085 \cdot e^{-0,06308 \cdot t}$ $R^2 = 0,98073$	$I_{DMT1}(t) = 1,85260 \cdot e^{-0,17424 \cdot t} - 1,42318 \cdot e^{-0,24346 \cdot t} + 0,57053 \cdot e^{-0,00155 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 0,92636 \cdot e^{-0,02232 \cdot t}$ $R^2 = 0,93996$	$I_{FPN}(t) = 0,44862 \cdot e^{-0,00178 \cdot t} + 0,55504 \cdot e^{-0,07239 \cdot t}$ $R^2 = 0,99837$	$I_{FPN}(t) = 0,08591 \cdot e^{0,02850 \cdot t} + 0,10043 \cdot e^{-0,00031 \cdot t} + 0,81430 \cdot e^{-0,04896 \cdot t}$ $R^2 = 0,99913$
4	$I_{DMT1}(t) = 1,04923 \cdot e^{-0,01145 \cdot t}$ $R^2 = 0,92452$	$I_{DMT1}(t) = 0,16945 \cdot e^{-0,00118 \cdot t} + 0,87033 \cdot e^{-0,01533 \cdot t}$ $R^2 = 0,92164$	$I_{DMT1}(t) = -0,20163 \cdot e^{-1,04604 \cdot t} + 0,48086 \cdot e^{-0,06489 \cdot t} + 0,72078 \cdot e^{-0,00224 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,00140 \cdot e^{-0,00771 \cdot t}$ $R^2 = 0,92496$	$I_{FPN}(t) = 0,59497 \cdot e^{0,00098 \cdot t} + 0,42224 \cdot e^{-0,03367 \cdot t}$ $R^2 = 0,93225$	$I_{FPN}(t) = 139,69535 \cdot e^{-0,04159 \cdot t} - 138,70238 \cdot e^{-0,04189 \cdot t} + 0,00494 \cdot e^{0,11423 \cdot t}$ $R^2 = 0,98862$
5	$I_{DMT1}(t) = 0,96235 \cdot e^{-0,00367 \cdot t}$ $R^2 = 0,78633$	$I_{DMT1}(t) = 0,91660 \cdot e^{-0,00149 \cdot t} + 0,08288 \cdot e^{-0,26694 \cdot t}$ $R^2 = 0,99879$	$I_{DMT1}(t) = 0,68117 \cdot e^{-0,63449 \cdot t} - 0,60645 \cdot e^{-0,72228 \cdot t} + 0,92528 \cdot e^{-0,00186 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,03655 \cdot e^{-0,00801 \cdot t}$ $R^2 = 0,90780$	$I_{FPN}(t) = 1,08239 \cdot e^{-0,00997 \cdot t} - 0,08257 \cdot e^{-0,29683 \cdot t}$ $R^2 = 0,96114$	$I_{FPN}(t) = 2,79655 \cdot e^{-0,00594 \cdot t} - 0,07662 \cdot e^{-0,31873 \cdot t} - 1,72008 \cdot e^{-0,00374 \cdot t}$ $R^2 = 0,96050$
6	$I_{DMT1}(t) = 1,01560 \cdot e^{-0,00479 \cdot t}$ $R^2 = 0,95460$	$I_{DMT1}(t) = 1,03398 \cdot e^{-0,00560 \cdot t} - 0,03610 \cdot e^{-0,33243 \cdot t}$ $R^2 = 0,98586$	$I_{DMT1}(t) = 30,73468 \cdot e^{-0,01002 \cdot t} - 0,00339 \cdot e^{-4,52929 \cdot t} - 29,73129 \cdot e^{0,01042 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,01009 \cdot e^{-0,00075 \cdot t}$ $R^2 = 0,20950$	$I_{FPN}(t) = 1,29969 \cdot e^{-0,00605 \cdot t} - 0,30172 \cdot e^{-0,03452 \cdot t}$ $R^2 = 0,71124$	$I_{FPN}(t) = -24,50732 \cdot e^{-0,04554 \cdot t} + 25,04862 \cdot e^{-0,04455 \cdot t} + 0,45373 \cdot e^{-0,01206 \cdot t}$ $R^2 = 0,97899$

Tabla 3.13. Curvas multi-exponenciales que predicen el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP y FPN1-TagRFP para cada célula Caco-2 estudiada, cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM y las células se desafiaron con 10 μM de FAS.

Célula N°	Función Mono-Exponencial	Función Bi-Exponencial	Función Tri-Exponencial
1	$I_{DMT1}(t) = 1,38522 \cdot e^{-0,08011 \cdot t}$ $R^2 = 0,92476$	$I_{DMT1}(t) = 23,53075 \cdot e^{-0,01545 \cdot t} - 22,47203 \cdot e^{-0,01420 \cdot t}$ $R^2 = 0,98932$	$I_{DMT1}(t) = 11,31369 \cdot e^{-0,13195 \cdot t} + 2,42069 \cdot e^{-0,24966 \cdot t} - 12,73171 \cdot e^{-0,16226 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,43165 \cdot e^{-0,08110 \cdot t}$ $R^2 = 0,87609$	$I_{FPN}(t) = 10,74808 \cdot e^{-0,01127 \cdot t} - 9,68754 \cdot e^{-0,00838 \cdot t}$ $R^2 = 0,97192$	$I_{FPN}(t) = 3,54598 \cdot e^{-0,32041 \cdot t} + 7,05405 \cdot e^{-0,13296 \cdot t} - 9,59921 \cdot e^{-0,20520 \cdot t}$ $R^2 = 0,99915$
2	$I_{DMT1}(t) = 1,04626 \cdot e^{-0,05926 \cdot t}$ $R^2 = 0,97956$	$I_{DMT1}(t) = 0,95685 \cdot e^{-0,04454 \cdot t} - 0,01899 \cdot e^{-0,04173 \cdot t}$ $R^2 = 0,98830$	$I_{DMT1}(t) = 0,16308 \cdot e^{-2,27116 \cdot t} + 1,07029 \cdot e^{-0,02405 \cdot t} - 0,23328 \cdot e^{-0,01198 \cdot t}$ $R^2 = 0,99994$
	$I_{FPN}(t) = 1,07054 \cdot e^{-0,05330 \cdot t}$ $R^2 = 0,97812$	$I_{FPN}(t) = 2,44582 \cdot e^{-0,02218 \cdot t} - 1,47889 \cdot e^{-0,01175 \cdot t}$ $R^2 = 0,99116$	$I_{FPN}(t) = 0,09464 \cdot e^{-0,88986 \cdot t} + 1,73537 \cdot e^{-0,01600 \cdot t} - 0,83065 \cdot e^{-0,00097 \cdot t}$ $R^2 = 0,99360$
3	$I_{DMT1}(t) = 1,06083 \cdot e^{-0,01619 \cdot t}$ $R^2 = 0,95624$	$I_{DMT1}(t) = 0,84859 \cdot e^{-0,02507 \cdot t} + 0,23361 \cdot e^{-0,00226 \cdot t}$ $R^2 = 0,95851$	$I_{DMT1}(t) = 0,65263 \cdot e^{-0,05714 \cdot t} - 0,20329 \cdot e^{-1,19490 \cdot t} + 0,55006 \cdot e^{-0,00145 \cdot t}$ $R^2 = 0,99879$
	$I_{FPN}(t) = 1,22048 \cdot e^{-0,01120 \cdot t}$ $R^2 = 0,74851$	$I_{FPN}(t) = 1,23347 \cdot e^{-0,00710 \cdot t} - 0,03212 \cdot e^{-0,04329 \cdot t}$ $R^2 = 0,76249$	$I_{FPN}(t) = 0,82594 \cdot e^{-0,07898 \cdot t} - 0,64303 \cdot e^{-0,37857 \cdot t} + 0,81577 \cdot e^{-0,00161 \cdot t}$ $R^2 = 0,98558$
4	$I_{DMT1}(t) = 1,03493 \cdot e^{-0,01191 \cdot t}$ $R^2 = 0,98889$	$I_{DMT1}(t) = 2,95317 \cdot e^{-0,00388 \cdot t} - 1,93093 \cdot e^{-0,00046 \cdot t}$ $R^2 = 0,98989$	$I_{DMT1}(t) = 2,39521 \cdot e^{-0,09741 \cdot t} - 2,19563 \cdot e^{-0,11116 \cdot t} + 0,79958 \cdot e^{-0,00606 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 1,03511 \cdot e^{-0,00698 \cdot t}$ $R^2 = 0,89926$	$I_{FPN}(t) = 0,69706 \cdot e^{-0,00695 \cdot t} + 0,33787 \cdot e^{-0,00695 \cdot t}$ $R^2 = 0,89928$	$I_{FPN}(t) = 1,49668 \cdot e^{-0,11948 \cdot t} - 1,38515 \cdot e^{-0,14414 \cdot t} + 0,88309 \cdot e^{-0,00287 \cdot t}$ $R^2 = 0,93043$
5	$I_{DMT1}(t) = 0,87665 \cdot e^{-0,02237 \cdot t}$ $R^2 = 0,92643$	$I_{DMT1}(t) = 0,58435 \cdot e^{-0,00907 \cdot t} + 0,42230 \cdot e^{-0,11991 \cdot t}$ $R^2 = 0,99834$	$I_{DMT1}(t) = 0,68109 \cdot e^{-0,01317 \cdot t} + 4,39416 \cdot e^{-0,29743 \cdot t} - 4,07582 \cdot e^{-0,31794 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 0,90292 \cdot e^{-0,02201 \cdot t}$ $R^2 = 0,93424$	$I_{FPN}(t) = 0,55817 \cdot e^{-0,08093 \cdot t} + 0,45592 \cdot e^{-0,00242 \cdot t}$ $R^2 = 0,99152$	$I_{FPN}(t) = 0,69205 \cdot e^{-0,01238 \cdot t} + 1,49533 \cdot e^{-0,26815 \cdot t} - 1,18795 \cdot e^{-0,35568 \cdot t}$ $R^2 = 0,99745$
6	$I_{DMT1}(t) = 0,43855 \cdot e^{-0,04587 \cdot t}$ $R^2 = 0,592838$	$I_{DMT1}(t) = 0,28772 \cdot e^{-0,02768 \cdot t} + 0,71222 \cdot e^{-0,79995 \cdot t}$ $R^2 = 0,99949$	$I_{DMT1}(t) = 0,22515 \cdot e^{-0,01912 \cdot t} + 0,61468 \cdot e^{-1,20881 \cdot t} + 0,16023 \cdot e^{-0,16246 \cdot t}$ $R^2 = 0,99999$
	$I_{FPN}(t) = 0,50516 \cdot e^{-0,04282 \cdot t}$ $R^2 = 0,63985$	$I_{FPN}(t) = 0,35609 \cdot e^{-0,0267 \cdot t} + 0,64386 \cdot e^{-0,83497 \cdot t}$ $R^2 = 0,99781$	$I_{FPN}(t) = 0,08480 \cdot e^{-0,01809 \cdot t} + 0,64324 \cdot e^{-0,82343 \cdot t} + 0,27179 \cdot e^{-0,03003 \cdot t}$ $R^2 = 0,99784$

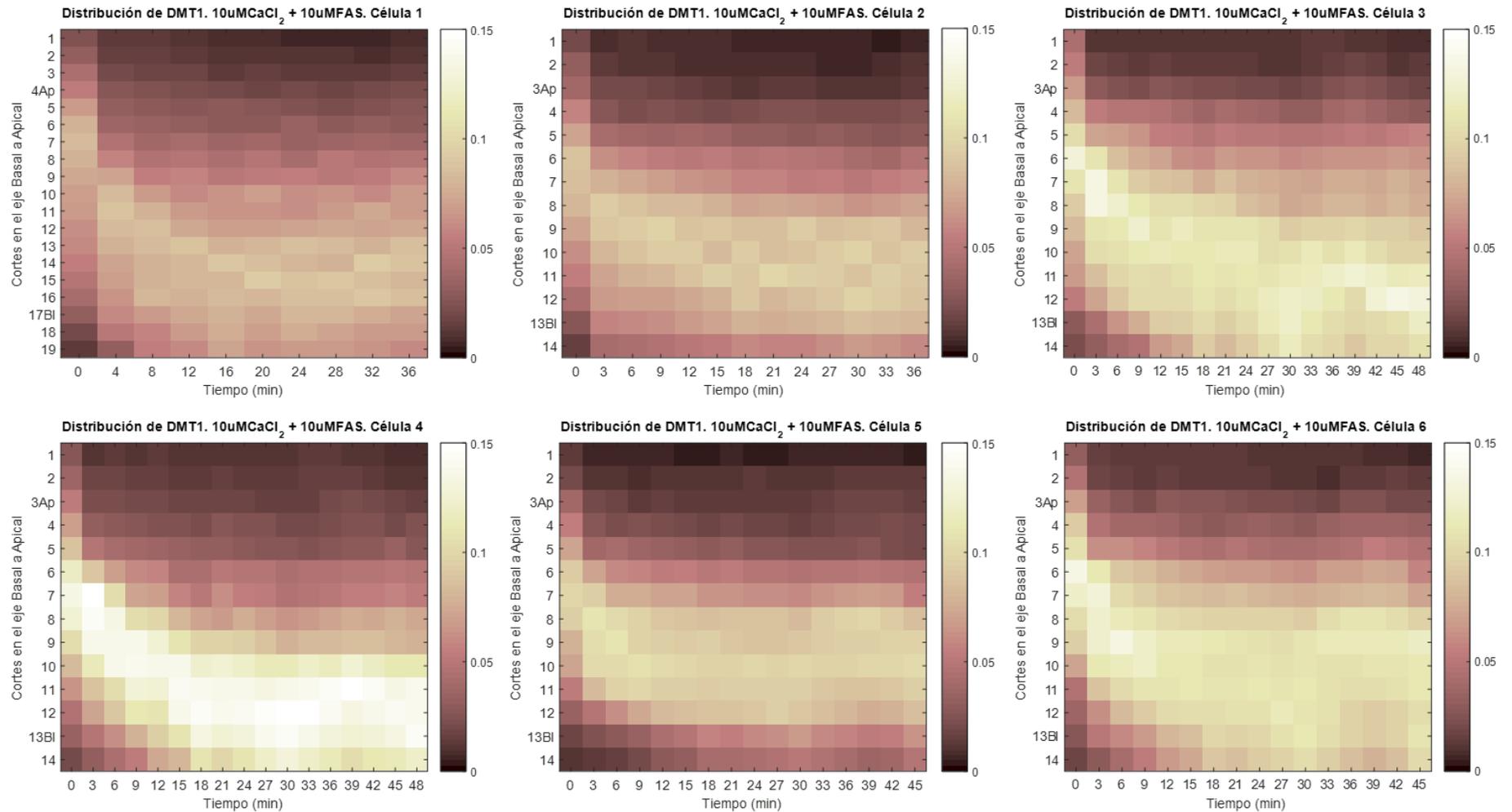


Figura 3.20. Relocalización en el tiempo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “BI” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje.

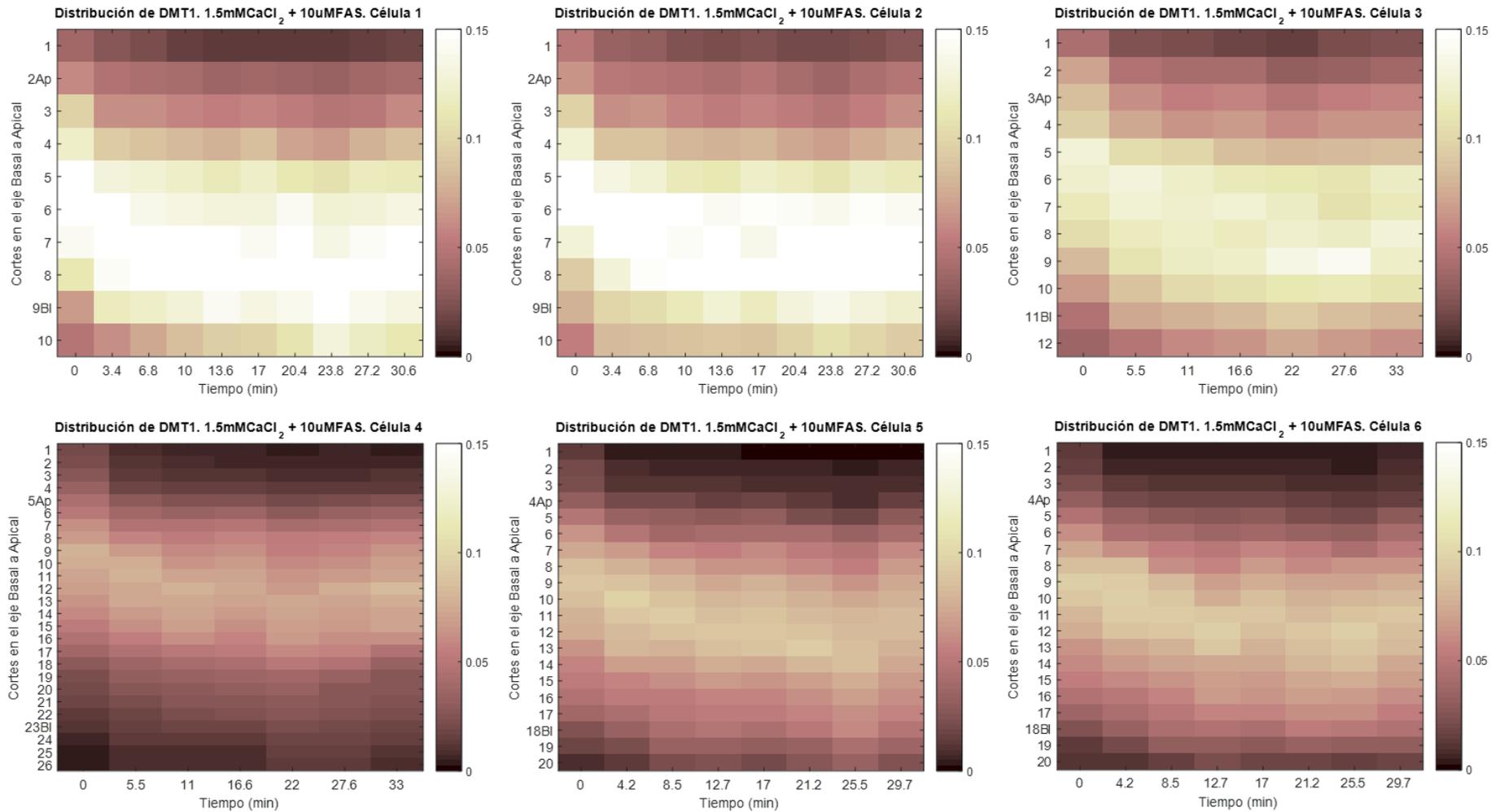


Figura 3.21. Relocalización en el tiempo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 1,5 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje.

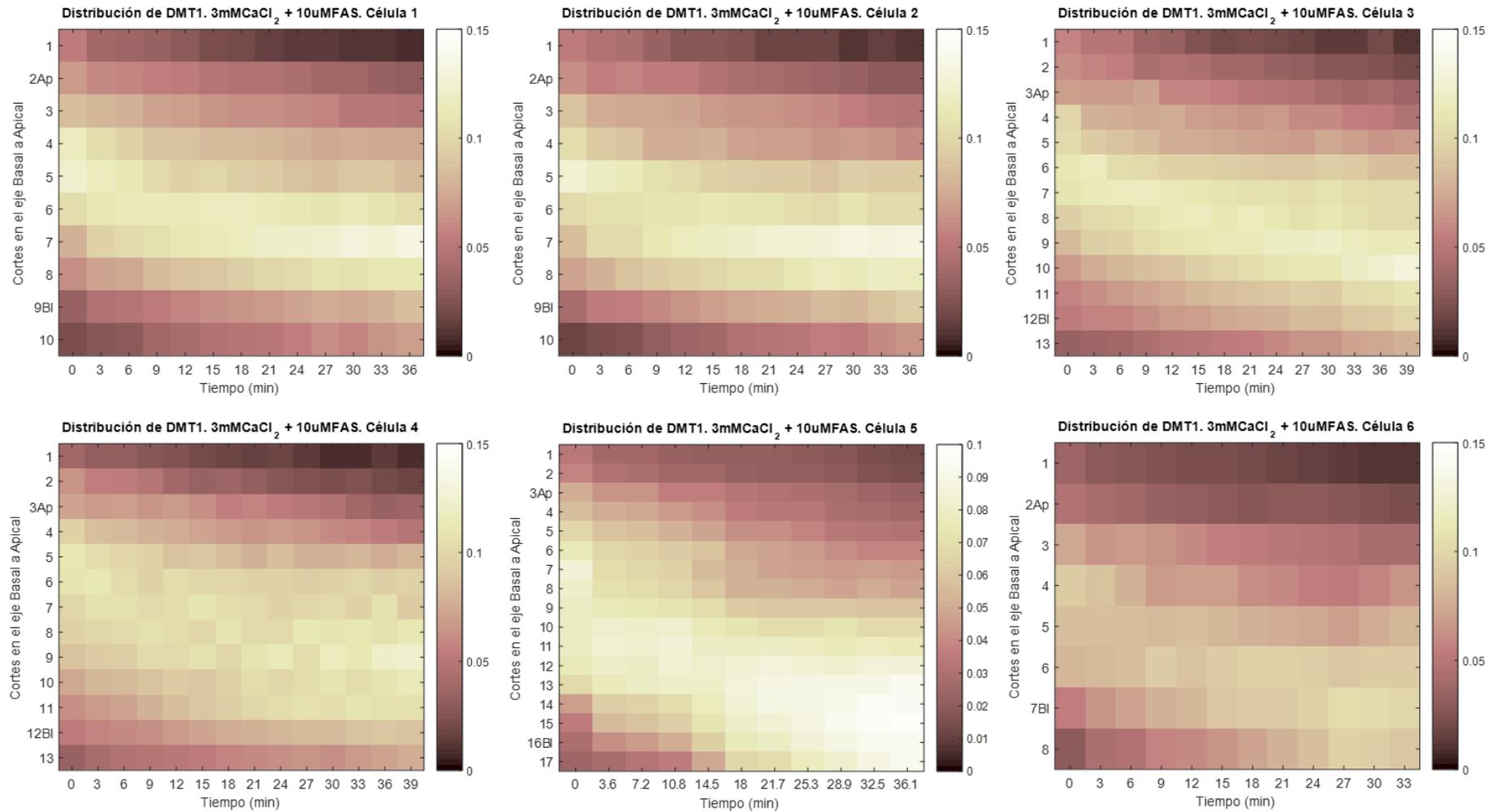


Figura 3.22. Relocalización en el tiempo de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 3 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje.

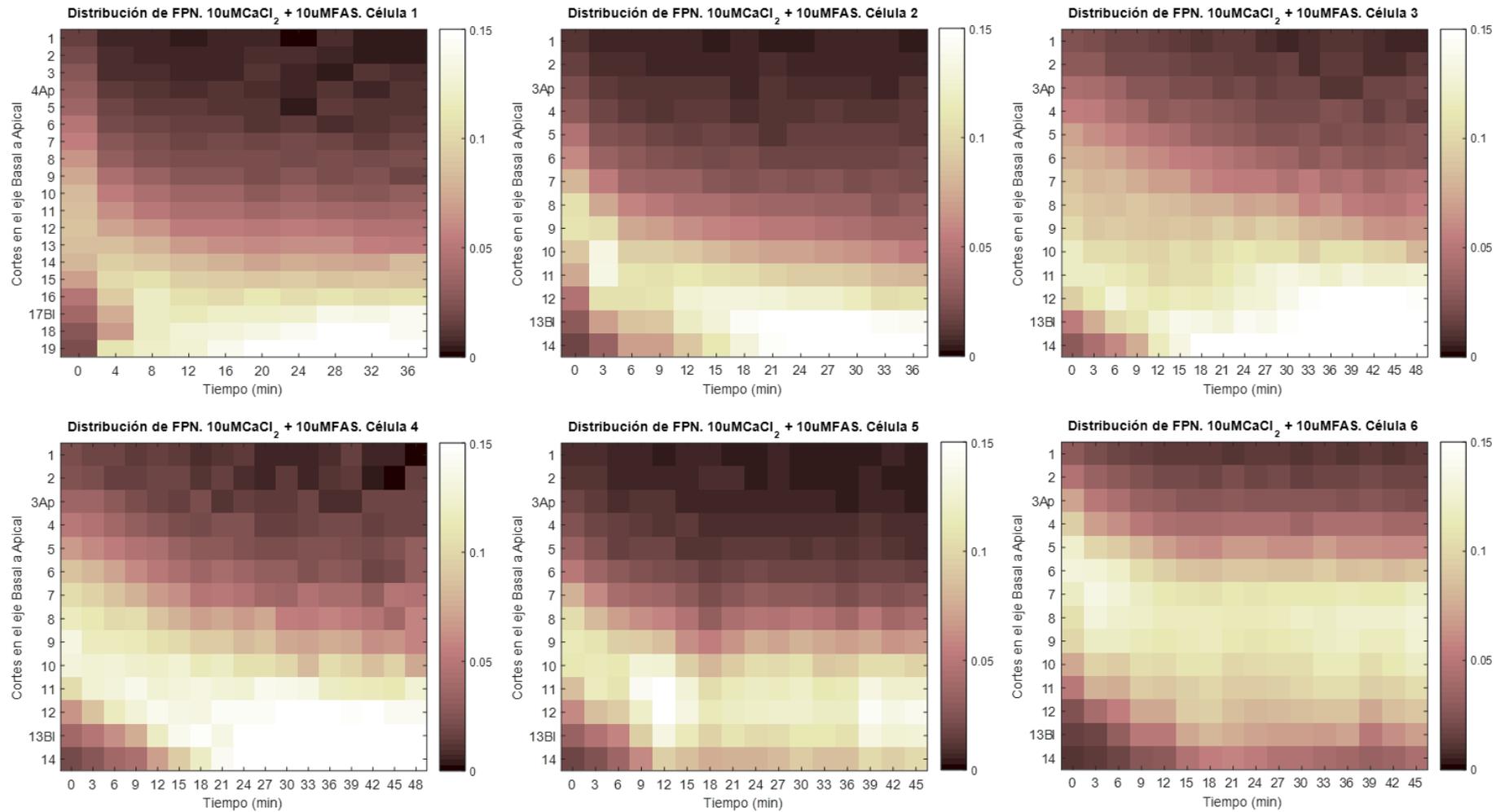


Figura 3.23. Relocalización en el tiempo de FPN-Tag-RFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje.

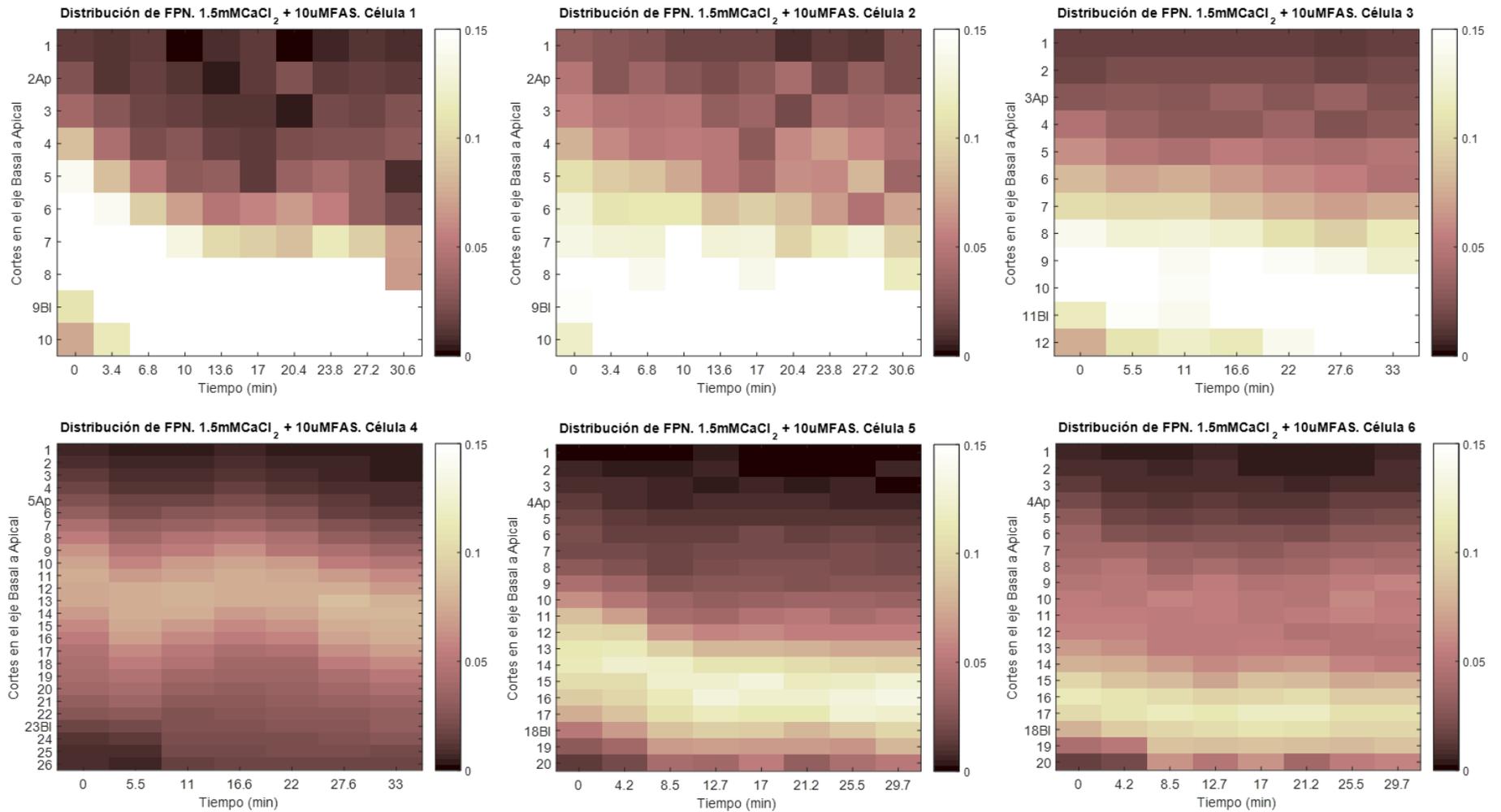


Figura 3.24. Relocalización en el tiempo de FPN-Tag-RFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 1,5 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje.

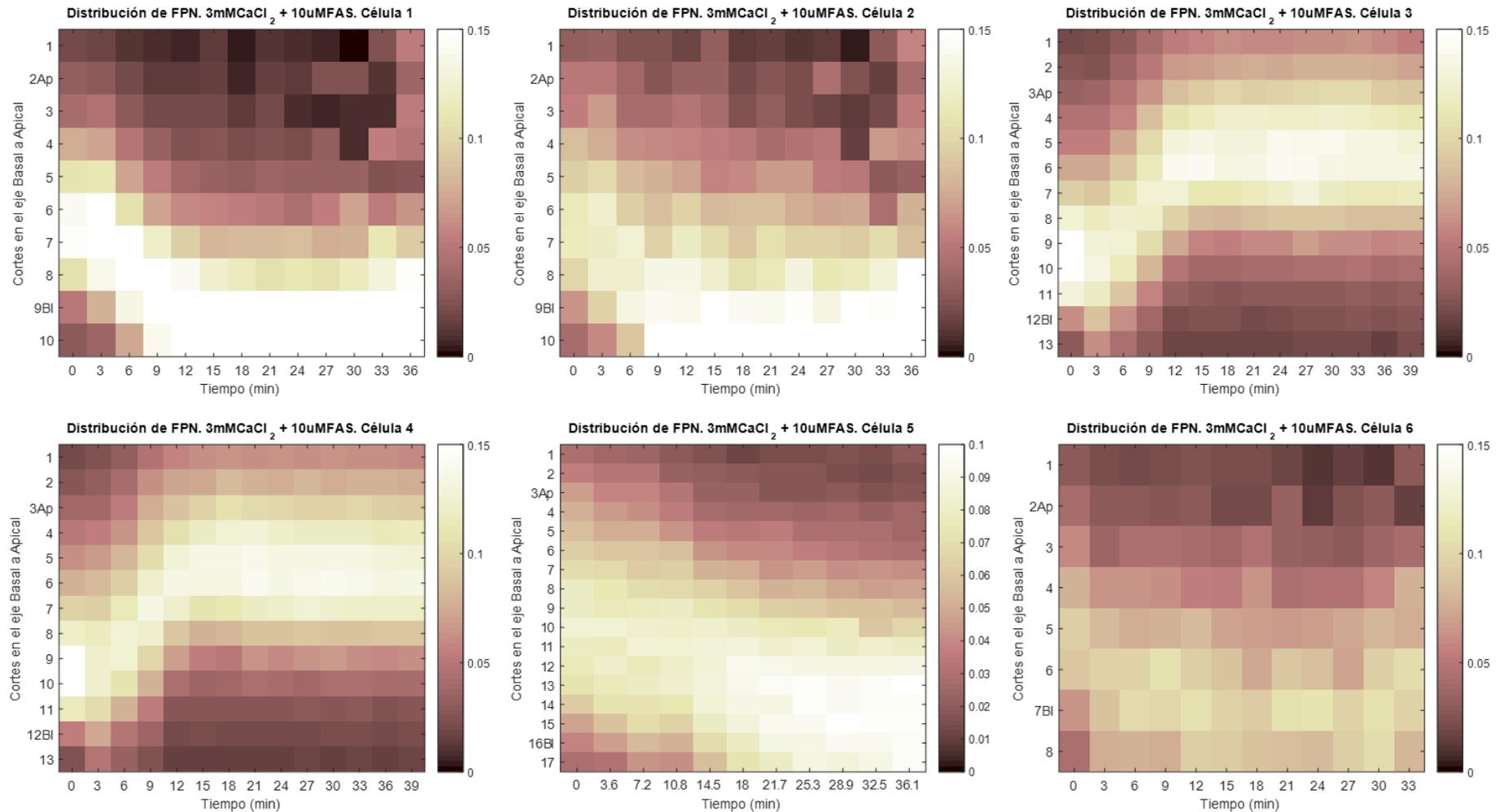


Figura 3.25. Relocalización en el tiempo de FPN-Tag-RFP entre los dominios apical–basal de cada célula estudiada, cuando esta se expone a 3 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS. En el eje “Cortes en el eje Basal a Apical”, “Ap” representa el último corte que se considerada perteneciente a la membrana apical contando desde el corte 1, y “Bl” representa el primer corte que se considerada perteneciente a la membrana basal contando desde ese corte hasta el último del eje.

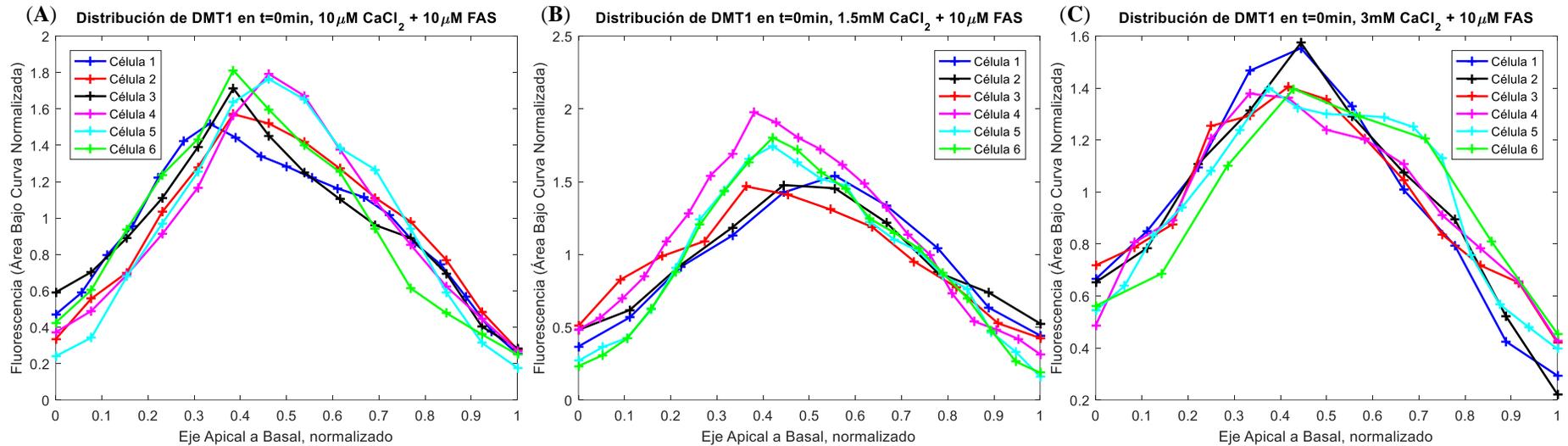


Figura 3.26. Perfil distribución de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal en el tiempo inicial, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 y 10 μM de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS, y (C) 3 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS.

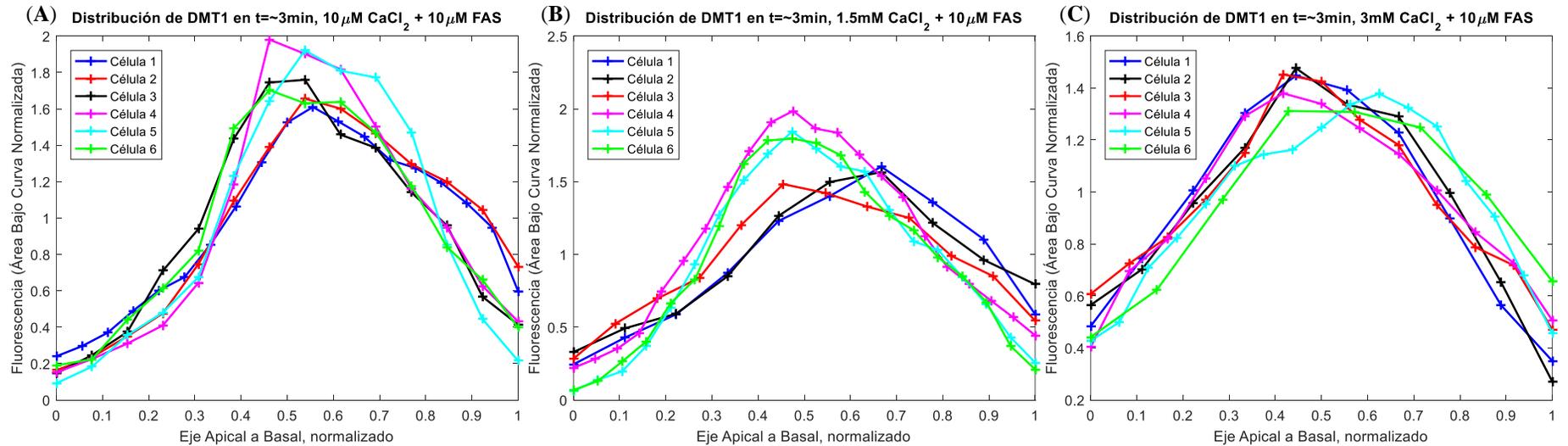


Figura 3.27. Perfil distribución de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal capturado para el instante de tiempo inmediatamente posterior a la adición del medio con la concentración de calcio a analizar, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μM de CaCl_2 y 10 μM de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS, y (C) 3 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS.

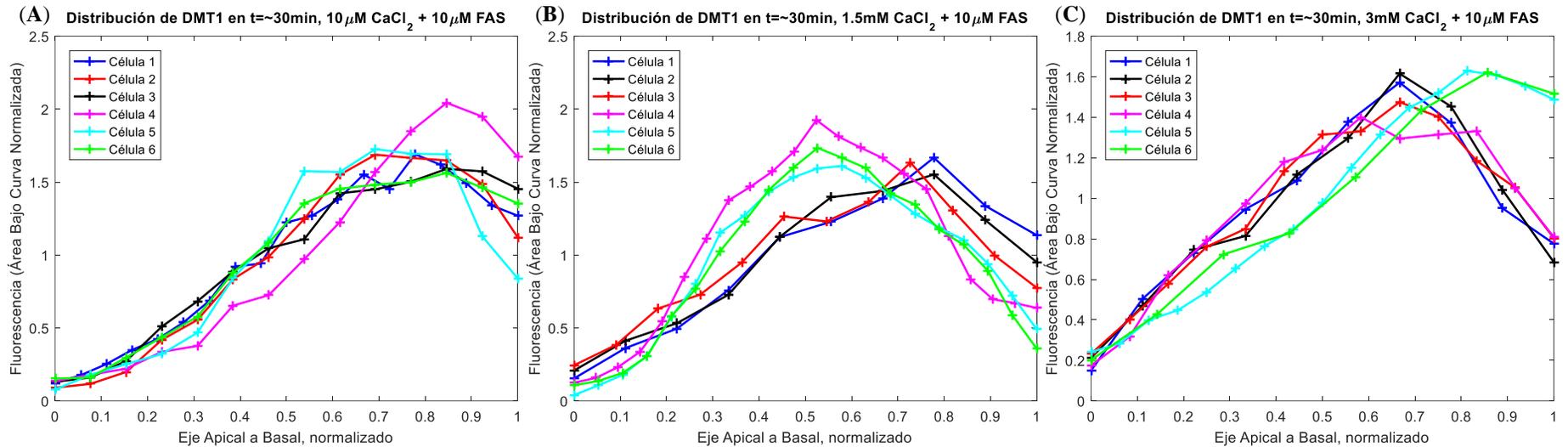


Figura 3.28. Perfil distribución de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP entre los dominios apical–basal capturado en ~ 24 minutos, para las células analizadas cuando estas se exponen a: **(A)** $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS, **(B)** $1,5 \text{ mM}$ de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS, y **(C)** 3 mM de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS.

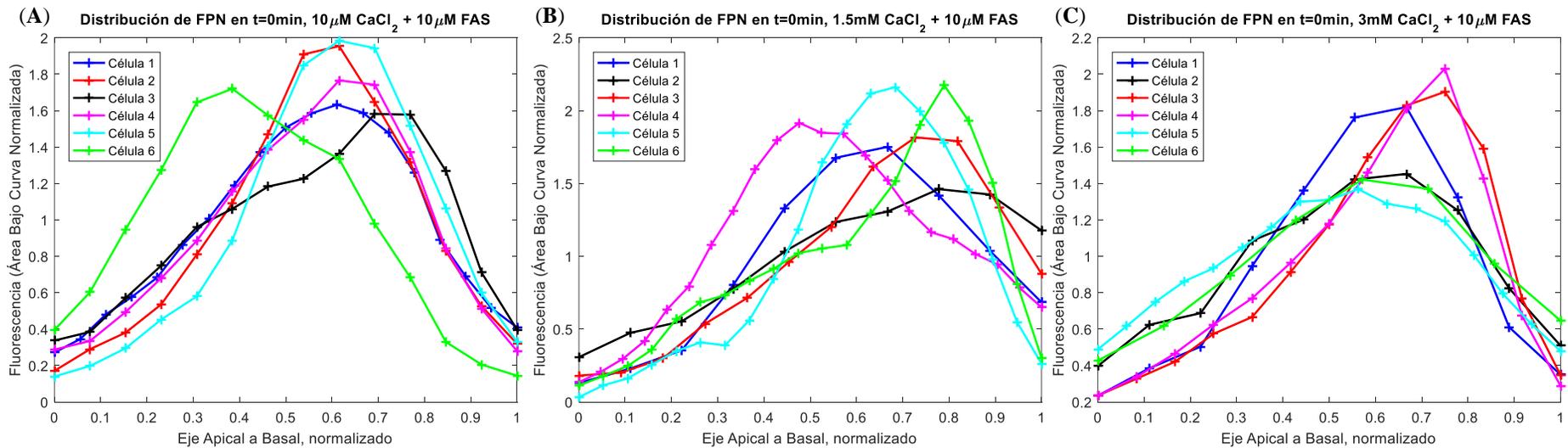


Figura 3.29. Perfil distribución de FPN-TagRFP entre los dominios apical–basal en el tiempo inicial, para las células analizadas cuando estas se exponen a: **(A)** $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS, **(B)** $1,5 \text{ mM}$ de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS, y **(C)** 3 mM de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS.

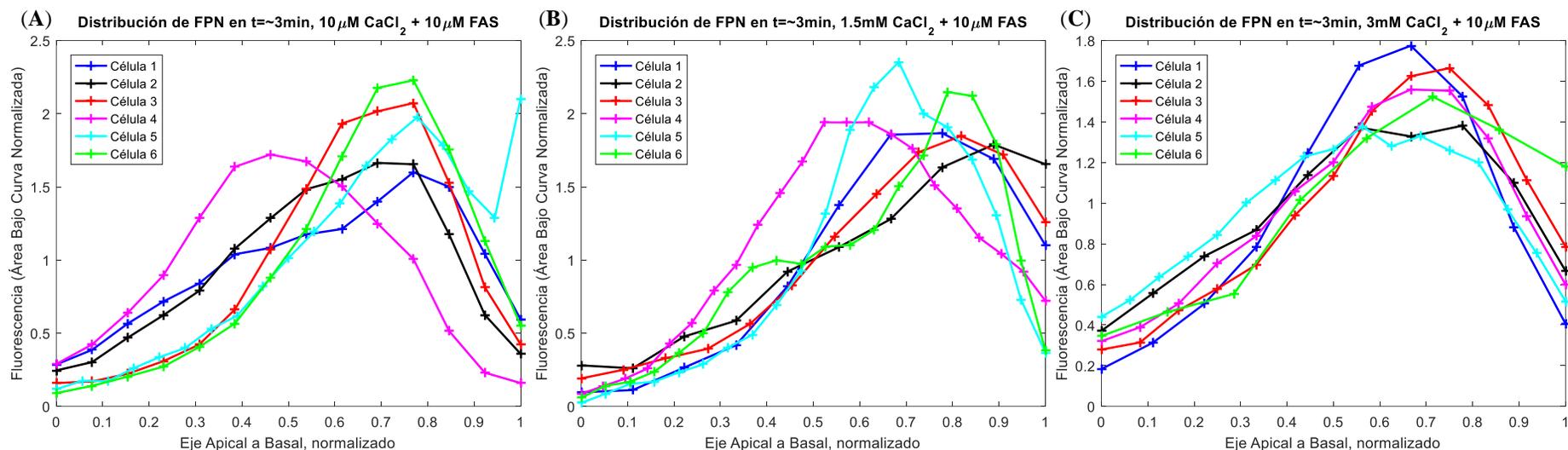


Figura 3.30. Perfil distribución de FPN-TagRFP entre los dominios apical–basal capturado para el instante de tiempo inmediatamente posterior a la adición del medio con la concentración de calcio a analizar, para las células analizadas cuando estas se exponen a: **(A)** $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $10\ \mu\text{M}$ de FAS, **(B)** $1,5\ \text{mM}$ de CaCl_2 y $10\ \mu\text{M}$ de FAS, y **(C)** $3\ \text{mM}$ de CaCl_2 y $10\ \mu\text{M}$ de FAS.

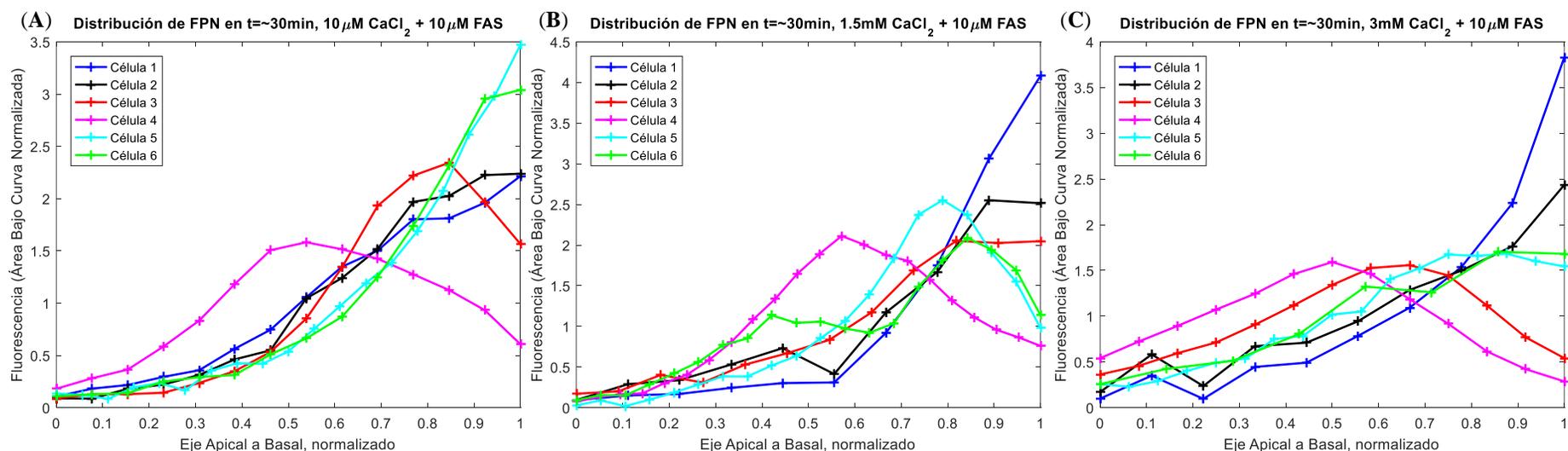


Figura 3.31. Perfil distribución de FPN-TagRFP entre los dominios apical–basal capturado en ~ 24 minutos, para las células analizadas cuando estas se exponen a: **(A)** $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $10\ \mu\text{M}$ de FAS, **(B)** $1,5\ \text{mM}$ de CaCl_2 y $10\ \mu\text{M}$ de FAS, y **(C)** $3\ \text{mM}$ de CaCl_2 y $10\ \mu\text{M}$ de FAS.

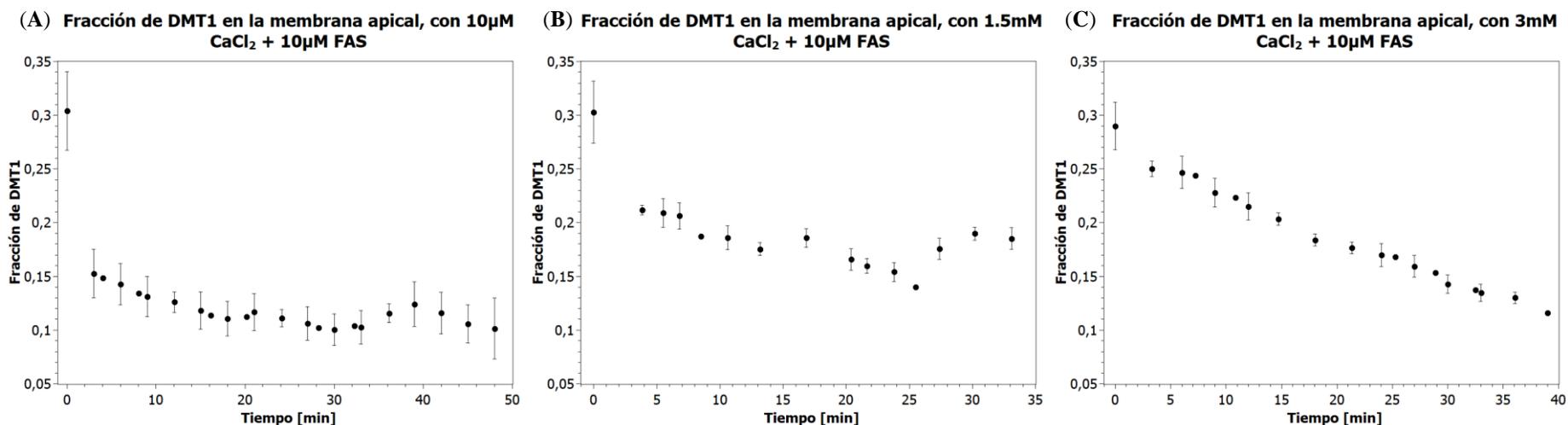


Figura 3.32. Fracción de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP en la membrana apical, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μ M de CaCl₂ y 10 μ M de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10 μ M de FAS, y (C) 3 mM de CaCl₂ y 10 μ M de FAS. Los resultados experimentales se presentan como las medias \pm D.E. de 6 células.

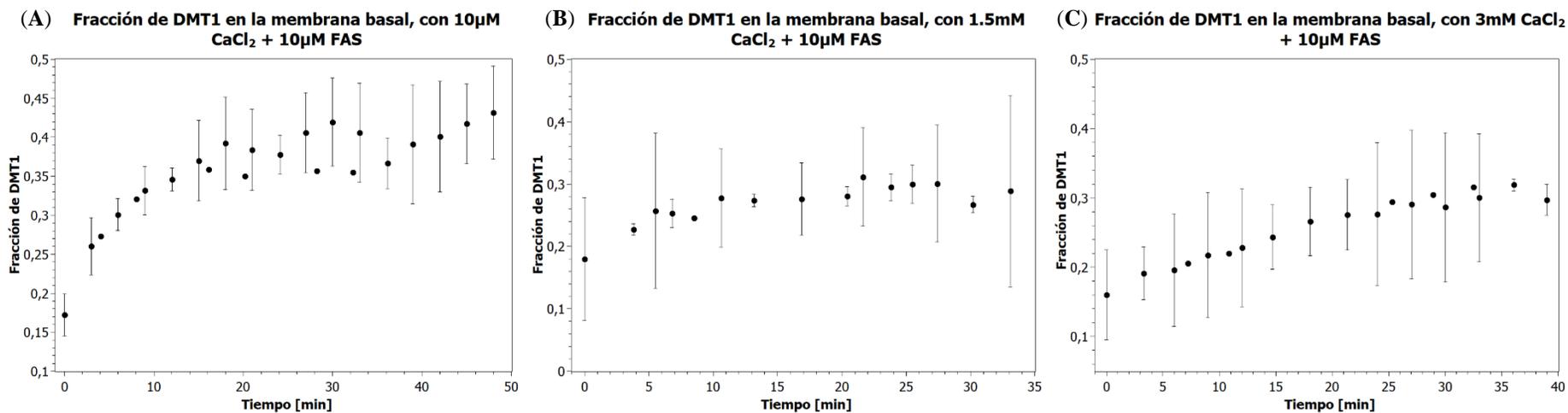


Figura 3.33. Fracción de DMT1-1A/IRE(+)-EGFP en la membrana basal, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μ M de CaCl₂ y 10 μ M de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10 μ M de FAS, y (C) 3 mM de CaCl₂ y 10 μ M de FAS. Los resultados experimentales se presentan como las medias \pm D.E. de 6 células.

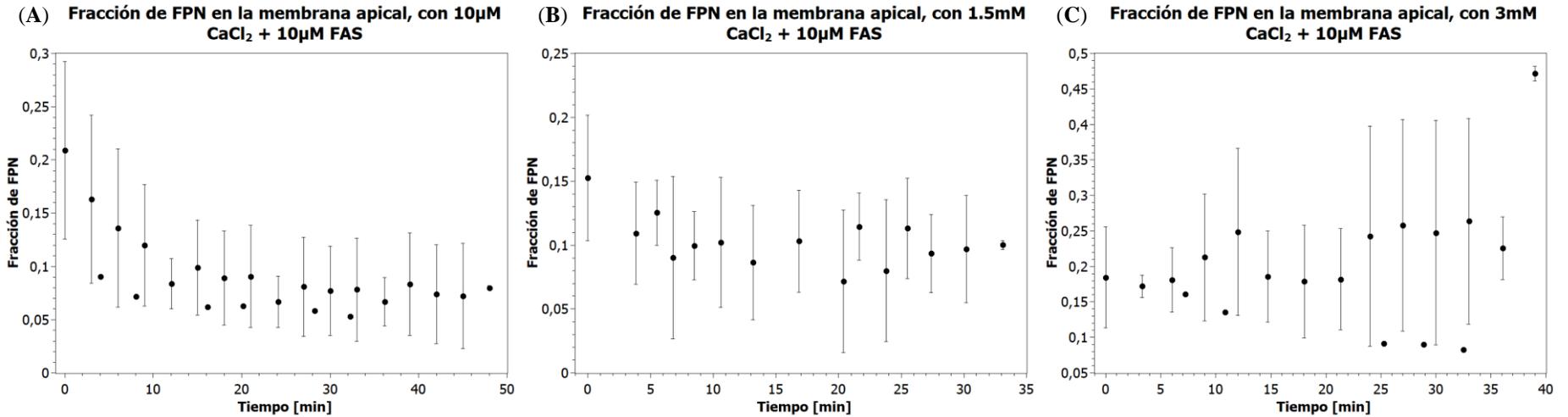


Figura 3.34. Fracción de FPN-TagRFP en la membrana apical, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μ M de CaCl₂ y 10 μ M de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10 μ M de FAS, y (C) 3 mM de CaCl₂ y 10 μ M de FAS. Los resultados experimentales se presentan como las medias \pm D.E. de 6 células.

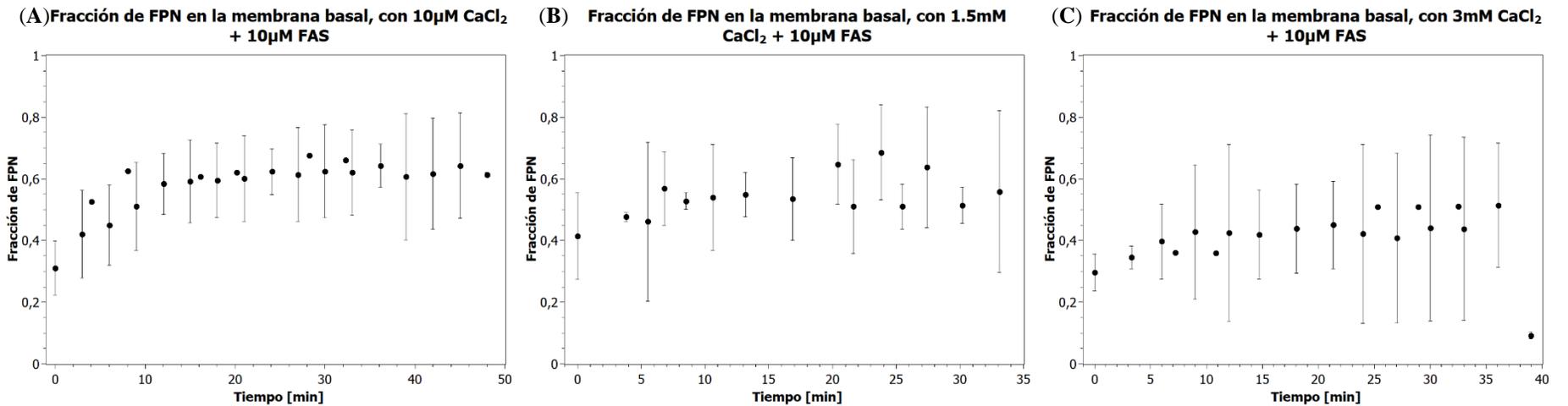


Figura 3.35. Fracción de FPN-TagRFP en la membrana basal, para las células analizadas cuando estas se exponen a: (A) 10 μ M de CaCl₂ y 10 μ M de FAS, (B) 1,5 mM de CaCl₂ y 10 μ M de FAS, y (C) 3 mM de CaCl₂ y 10 μ M de FAS. Los resultados experimentales se presentan como las medias \pm D.E. de 6 células.

En el minuto 36 se observa un pequeño retorno de DMT1 a la membrana apical, pero este tampoco es significativo. Por lo tanto, la presencia continua de hierro en la cámara apical con una concentración muy baja de calcio parece permitir que los niveles de DMT1 apicales decrezcan y alcancen rápidamente el equilibrio, lo que permitiría una gran captación apical de hierro inmediatamente después de exponer las células a este metal, pero limitaría la continua captación de Fe^{2+} desde el medio extracelular al mantener a DMT1 internalizada.

La concentración de DMT1 en la membrana basal aumentó drásticamente ($\sim 51,2\%$) cuando las células Caco-2 se expusieron a $10\ \mu\text{M}$ de FAS junto con $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 y continuó aumentando de forma significativa hasta los 27 minutos (Figura 3.33(A)), luego de los cuales se observan ligeros aumentos que no alcanzan a ser significativos. Si se compara el perfil de distribución obtenido en ~ 3 minutos (Figura 3.27(A)) respecto al obtenido en ~ 30 minutos del experimento (Figura 3.28(A)), se puede apreciar que este transportador se mueve desde la zona central de la célula a los dominios basales.

La exposición a hierro junto con $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 indujo un aumento significativo de FPN basal ($\sim 35\%$) durante los primeros 3 minutos de exposición al hierro que continua hasta el minuto 12 de observación (ver Figura 3.23 y Figura 3.35(A)), después del cual parece alcanzarse un equilibrio. Por otro lado, los niveles de FPN en la membrana apical disminuyen significativamente desde el instante posterior a la exposición con hierro ($\sim 22\%$) (Figura 3.34), y continúan descendiendo hasta alcanzarse un equilibrio luego de aproximadamente 12 minutos de observación, que permitiría una reducción del eflujo apical de hierro. Si se comparan los perfiles de distribución de FPN obtenidos al inicio del experimento (Figura 3.29(A)), y luego de 3 minutos (Figura 3.30(A)) y 30 minutos (Figura 3.31(A)), aunque se evidencia que efectivamente FPN se reposiciona hacia los dominios basales, también es notorio que las curvas de cada célula tienen comportamientos mucho menos homogéneos entre sí, respecto a los perfiles de distribución observados para DMT1. Esto implicaría que, aunque el efecto de las condiciones experimentales acá analizadas es reposicionar FPN hacia el compartimiento basal, su patrón de reposicionamiento no es tan conservado como lo es para DMT1.

La relocalización de FPN hacia los dominios basales tiene sentido ya que se necesita de la presencia de este transportador en la membrana basal para mediar la salida de hierro desde la célula. Sin embargo, el reposicionamiento observado para DMT1 será el que permitirá regular la absorción de hierro, ya que debería dar como resultado una disminución de la captación apical de hierro (Figura 2.1).

3.3.2.2 Análisis del efecto de un desafío de $10\ \mu\text{M}$ de FAS en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, realizado cuando el medio del cultivo tiene una concentración final de calcio de $1,5\ \text{mM}$ de CaCl_2

Cuando las células Caco-2 se desafían con $10\ \mu\text{M}$ de FAS en la cámara apical junto con $1,5\ \text{mM}$ de CaCl_2 , la concentración de FPN apical disminuyó $\sim 28\%$ respecto a la observada antes del desafío con hierro, como puede observarse en las Figura 3.24 y Figura 3.35(B). Sin embargo, esta disminución de los niveles de FPN en la membrana apical no llegaron a ser estadísticamente significativos en los experimentos desarrollados. Por otro lado, FPN en la membrana basal aumentó $\sim 15\%$ dentro de los primeros 3 minutos de exposición al hierro, pero, como ocurrió con los niveles de FPN apical, los cambios en los niveles de FPN basal tampoco fueron estadísticamente significativos (Figura 3.34(B)). Si se comparan los perfiles de distribución de FPN para todas las células analizadas al inicio del experimento (Figura 3.29(B)) respecto a los perfiles obtenidos luego de 3 minutos (Figura

3.30(B)), se observan cambios muy sutiles, pero si se comparan estos con los alcanzados luego de 30 minutos (Figura 3.31(B)), se hace notorio que sólo para las células 1 y 2 existe una mayor relocalización de FPN hacia los dominios apicales, mientras que en el resto de las células los cambios siguen siendo muy pequeños.

Como se puede apreciar en la Figura 3.21 y en la Figura 3.33(B), se encontró un aumento de ~27 % de la concentración de DMT1 en la membrana basal respecto a la concentración de DMT1 inicial basal luego de 3 minutos del desafío de hierro junto con 1,5 mM de Ca^{2+} , pero este aumento de DMT1 en la membrana basal no fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) hasta los 10 minutos de observación, donde los niveles de DMT1 basales habían incrementado en ~55 %. Luego de estos 10 minutos, parece alcanzarse un equilibrio. Se encontró también una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de ~30 % en la concentración de DMT1 en la membrana apical detectada dentro de los primeros 3 minutos de observación, que se mantiene hasta el minuto 17, luego del cual los niveles de DMT1 vuelven a disminuir de manera significativa entre los 20 y 25 minutos de observación, y a partir de ese momento se evidencia un retorno significativo de DMT1 a la membrana apical, recuperándose un 16 % del transportado hasta el minuto 33 de observación respecto al detectado en el minuto 25. La disminución inicial de ~30 % observada para DMT1 apical se corresponde con la reportada previamente por Ma y col. (2006), quienes reportaron que dentro de los 10 minutos de la exposición de las células Caco-2 al hierro en la membrana apical se internalizaba más del 30 % de DMT1. Por otro lado, al analizar el perfil de distribución de DMT1 luego de 30 minutos de observación (Figura 3.28(B)), se puede apreciar que se la mayor concentración de este transportador se ubica en la zona central de la célula y no en los dominios basales, lo cual se explica por el retorno observado de DMT1 hacia la membrana apical luego de 25 minutos de exposición al hierro.

La menor relocalización de FPN hacia la membrana basal, podría deberse a la menor internalización de DMT1 respecto a la observada cuando las células se exponen a hierro junto con una concentración de calcio extracelular de 10 μM , lo cual debe representar una menor captación de hierro desde la membrana apical, tal como se observó en el Capítulo 2 de este manuscrito, donde se propuso que la unión de DMT1 a hierro fue inhibida de manera no competitiva por el calcio extracelular, lo que a su vez inhibió la captación de hierro mediada por DMT1 en células Caco-2. Por lo tanto, se necesitarían menos transportadores (FPN) para mediar la transferencia de hierro desde la célula al medio basolateral.

3.3.2.3 Análisis del efecto de un desafío de 10 μM de FAS en la relocalización de los transportadores DMT1 y FPN, realizado cuando el medio del cultivo tiene una concentración final de calcio de 3 mM de CaCl_2

En la membrana apical, FPN disminuyó ~7 % dentro de los primeros 3 minutos de exposición al hierro junto con 3 mM de calcio extracelular. Aunque los niveles de FPN apicales continúan disminuyendo durante todo el tiempo de observación (Figura 3.34 (C)), estos cambios nunca son significativos respecto al nivel de FPN apical detectado al inicio del experimento. Por otro lado, FPN en la membrana basal aumentó durante todo el tiempo, pero de manera no significativa (Figura 3.35(C)), teniendo un aumento de ~16 % en los primeros 3 minutos luego de exponer a las células con hierro. Los perfiles de distribución de FPN en diferentes instantes de tiempo mostrados (Figura 3.29(C), 3.30(C) y 3.31(C)) indican que efectivamente FPN se relocaliza hacia los dominios basales en el transcurso del tiempo, aunque esta relocalización fue mucho menor para las células 3 y 4 analizadas bajo las condiciones experimentales descritas en este caso, donde FPN al final del experimento

predominó en la zona central de la célula, lo cual también se observa claramente al ver la [Figura 3.25](#). Si se comparan estos resultados de la relocalización de FPN respecto a los obtenidos en la sección anterior, se evidencia que la disminución de FPN apical y el aumento de FPN basal justo después de la exposición a hierro, es menor cuando el desafío de hierro se realiza junto con 3 mM de CaCl₂ respecto a cuando se realiza con 1,5 mM de CaCl₂, lo que implica una disminución de la transferencia de hierro al medio basolateral.

Respecto a los niveles de DMT1 apicales, la exposición de las células a hierro en el compartimiento apical en un medio con 3 mM de CaCl₂, indujo la internalización de DMT1, la cual es estadísticamente significativa durante todo el experimento ($p < 0,05$) ([Figura 3.22](#) y [Figura 3.32\(C\)](#)), y durante los primeros 3 minutos de exposición a hierro implicó una reducción de ~14 % de los niveles apicales de DMT1. Sin embargo, esta disminución es menor a la reportada en la sección anterior (de ~30 %), lo cual implica que duplicar la concentración extracelular de calcio reduce la concentración de DMT1 que se internaliza. Se encontró también un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de ~20 % en la concentración de DMT1 en la membrana basal detectada dentro de los primeros 3 minutos de observación, y este aumento es estadísticamente significativo durante todo el experimento ([Figura 3.33\(C\)](#)). El aumento de DMT1 basal acá observado también es menor al observado cuando el desafío de hierro se realiza en presencia de 1,5 mM de CaCl₂. La menor internalización de DMT1 observada en este caso, respecto a la reportada cuando el desafío de hierro se realiza en presencia de 1,5 mM de Ca²⁺, están acorde con la evidencia presentada en el Capítulo 2, donde se indicó que el calcio extracelular inhibe la entrada de hierro en el cLIP de las células Caco-2 de manera dependiente de la concentración, ya que mientras menor sea la sustracción de DMT1 de la membrana apical, el número de DMT1 que estarán transportando Fe²⁺ desde el medio extracelular apical hacia el citosol será menor, lo que lleva a una menor captación de hierro por parte de las células.

Contrario a lo encontrado cuando las células sólo se exponen a 3 mM de Ca²⁺, donde se observó una disminución de los niveles de DMT1 desde la membrana apical de ~26 % en los primeros 3 minutos de observación, cuando estos 3 mM de Ca²⁺ vienen acompañados con 10 μM de FAS, la disminución de la concentración apical de este transportador fue de ~14 %. Esto indica que, si las células se exponen únicamente a altas concentraciones de calcio, este metal inducirá una drástica internalización de DMT1, lo que hará que si las células se exponen posteriormente a hierro tengan una menor captación de este metal al haber una menor disponibilidad de DMT1 en la membrana apical. Por otro lado, si las células se exponen a una alta concentración de calcio junto con un desafío de hierro, el efecto originado por la interacción de estos dos metales será mantener secuestrada DMT1 en la membrana apical, lo que traerá como consecuencia un menor transporte de hierro hacia el medio intracelular. Estos resultados muestran que el efecto inhibitorio del Ca²⁺ en la captación de hierro mediada por DMT1 en células Caco-2 dependerá si este metal se presenta o no junto con Fe²⁺, llevando a proponer que:

- (i) Si las células Caco-2 se exponen a las altas concentraciones de calcio en el compartimiento apical sin la presencia de hierro, Ca²⁺ se une a un sitio alostérico no catalítico de DMT1 y se induce la internalización de este transportador. Por lo tanto, el movimiento de las vesículas de origen apical que contienen DMT1 dependerá de la concentración de calcio que estas contienen.
- (ii) Si las células Caco-2 se exponen a las altas concentraciones de calcio en el compartimiento apical en presencia de hierro ferroso, la mayoría de DMT1 se une a estos dos metales, Ca²⁺ se une a un sitio alostérico no catalítico de DMT1 y Fe²⁺ se

une a su sitio de unión con DMT1, y la unión de este transportador a estos dos metales hará que se mantenga secuestrado en la membrana apical, es decir, se afecta la capacidad de salida de DMT1 de esta membrana. Además, en este caso, el tráfico endosómico de las vesículas de origen apical que contienen DMT1 no sólo dependerá de la concentración de calcio que estas contienen, sino también de su concentración de hierro.

Esta propuesta también concuerda con los resultados obtenidos al exponer las células a $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 con $10 \mu\text{M}$ de FAS, donde se obtuvo la mayor internalización de DMT1 (~50 %) al inicio del experimento, pues al ser tan pequeña la concentración de calcio, la concentración de transportadores unidos a hierro y calcio será insignificante, lo que permitirá que la eficiencia de transporte de Fe^{2+} por parte de los transportadores disponibles en la membrana apical sea mucho mayor, tal como lo reflejan los experimentos con calceína.

Para cada condición experimental representada en la [Figura 3.32](#), los modelos lineales que aproximan la derivada temporal de las mediciones experimentales después de la adición de FAS en presencia de alguna de las tres concentraciones de calcio utilizadas se obtuvieron a través del método de la secante, ajustando los dos primeros puntos de cada curva, y se presentan en la [Tabla 3.14](#). Las tasas de cambio obtenidas son mayores (en valor absoluto) para la adición de FAS en el medio con $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} , y estas indican que la tasa de internalización de DMT1 desde la membrana apical es menor mientras mayor sea la concentración extracelular de Ca^{2+} .

Tabla 3.14. Modelos lineales de la internalización de DMT1 desde la membrana apical, debida a un desafío de hierro ($10 \mu\text{M}$ de FAS) junto con un cambio de la concentración de Ca^{2+} . Estos modelos se ajustan a los dos primeros datos de la fracción de DMT1 en la membrana apical (f) en el tiempo (t) dado en minutos.

$10 \mu\text{M}$ de FAS y $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+}	$10 \mu\text{M}$ de FAS y $1,5 \text{mM}$ Ca^{2+}	$10 \mu\text{M}$ de FAS y 3mM Ca^{2+}
$f = -0,0504 \cdot t + 0,3039$	$f = -0,0238 \cdot t + 0,3028$	$f = -0,0121 \cdot t + 0,2900$

3.4 Conclusión

El objetivo principal del presente capítulo fue caracterizar experimentalmente el movimiento de los transportadores DMT1-1A/IRE(+) y FPN1A en las células Caco-2 polarizadas a corto plazo, inducido por diferentes concentraciones de calcio extracelular en el compartimiento apical, en presencia o en ausencia de hierro no hemo. La relocalización de los transportadores se realizó utilizando microscopía confocal para realizar el seguimiento de las proteínas fluorescentes DMT1-EGFP y FPN-TagRFP.

Usando células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales como modelo de epitelio intestinal, se mostró que las mayores diferencias encontradas en la cinética de relocalización de los transportadores estudiados ante distintas concentraciones de calcio se encuentran para DMT1, ya que los cambios en los niveles de FPN en las membranas apicales y basales en la mayoría de los casos no fueron estadísticamente significativos. Cuando las células se exponen a altas concentraciones de calcio (3mM), e incluso cuando se exponen a concentraciones de calcio cercanas a las encontradas en los medios de cultivo tradicionales ($1,5 \text{mM}$), disminuye significativamente la concentración de DMT1 en la membrana apical,

lo cual implica una reducción en el transporte hierro desde la membrana apical extracelular al citosol ante un posterior desafío de hierro, siendo el calcio capaz de esta manera de regular negativamente la captación de hierro en las células Caco-2.

La evidencia experimental reportada en este capítulo indica que, al disminuir la concentración de calcio en el medio extracelular a $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 , la concentración de DMT1 aumenta significativamente en la membrana apical, aumentando así su disponibilidad para la captura apical de hierro. Por otro lado, cuando el hierro se agrega en presencia de $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 , la internalización de DMT1 ocurre de manera más eficiente, favoreciéndose así la captación inicial de hierro apical e intensificándose el proceso regulatorio de bloqueo de la mucosa, pues la internalización de estos transportadores desde el dominio apical es casi total cuando las células Caco-2 se exponen a hierro con concentraciones bajas de calcio. Por el contrario, se observó que mientras mayor es la concentración de calcio extracelular, mayor será la internalización de DMT1, pero si las células se exponen a estas altas concentraciones de calcio junto con un desafío de hierro se induce una relocalización de DMT1 a los compartimientos intracelulares más lenta mientras más elevada sea la concentración de Ca^{2+} , limitando la función de captación apical de hierro de DMT1 ya que este transportador se mantiene secuestrado en la membrana apical.

La función de barrera de las uniones estrechas en las células Caco-2 depende de manera crítica de la presencia de Ca^{2+} extracelular (Ma y col., 2000), por ello, al utilizar una concentración de calcio tan reducida en estos experimentos era importante verificar el TEER, el cual siempre se mantuvo superior $240 \Omega \cdot \text{cm}^2$ a antes y después de las mediciones en el microscopio confocal.

Los resultados reportados acá con $1,5 \text{ mM}$ Ca^{2+} y $10 \mu\text{M}$ de FAS están acordes con reportes previos sobre el análisis de la relocalización de DMT1 y FPN durante la absorción de hierro desde la membrana apical, donde se indica que en las células Caco-2 luego de una privación de hierro, se da la internalización de más del 30 % de DMT1 luego de los primeros minutos de exposición a hierro (Ma y col., 2006; Núñez, 2010). Esto indica que en estos reportes posiblemente las células se expusieron a hierro en un medio de cultivo con una concentración de calcio cercana a $1,5 \text{ mM}$ y, por lo tanto, existía un efecto inhibitorio en la captación de hierro por parte del calcio.

Se ha propuesto que el posible efecto inhibidor del calcio en la absorción de hierro se debe a una interacción entre estos minerales en un punto común de la absorción de hierro hemo y no hemo (Cook y col., 1991; Hallberg y col., 1992; Lönnerdal, 2010). Varios investigadores señalan que esta interacción ocurre durante la exportación de hierro al torrente sanguíneo desde la membrana basolateral de los enterocitos, debido a que FPN es el único exportador de hierro celular conocido para ambas formas de hierro (Hallberg y col., 1993; Lönnerdal, 2010); sin embargo, se ha reportado que proteínas del grupo FLVCR y ABCG2 pueden transportar hierro hemo directamente al torrente sanguíneo (Krishnamurthy y col., 2007; Chifman y col., 2014). Por otro lado, se ha reportado que la transferencia al plasma de hierro hemo y no hemo tienen cinéticas diferentes, lo cual indicaría que estas formas de hierro no se encuentran en un grupo de absorción común (Roughead y col., 2005).

Hasta ahora no se ha reportado evidencia de la relocalización de DMT1 y de FPN en el tiempo debida a la presencia de calcio extracelular, en presencia o ausencia de hierro. Los resultados acá presentados indican por primera vez que el ciclo endocítico del transportador DMT1 en las células Caco-2 polarizadas está determinado no sólo por la presencia de hierro en el compartimiento apical, sino también por la concentración de calcio en ese compartimiento. Los hallazgos obtenidos al realizar el seguimiento de la fluorescencia verde

de DMT1 y roja de FPN con microscopía confocal, unidos a los obtenidos a partir de los experimentos con calceína-AM, sugieren que el calcio inhibió de manera no competitiva la captación de hierro mediada por DMT1 en células Caco-2. Aunque DMT1 no media la captación de hierro hemo, sí permite la exportación al citosol de Fe^{2+} liberado desde el hierro hemo, a través de un mecanismo actualmente desconocido (Zhang y Enns, 2008; Yanatori y col., 2016). Por lo tanto, el punto común para la captación de las dos formas de hierro podría ser el transportador DMT1.

Los resultados experimentales presentados podrían ayudar en la toma de decisiones sobre los planes de suplementación alimentaria de hierro y/o calcio, y en el desarrollo de suplementos dietéticos, especialmente para los grupos poblacionales que tienen ingestas inadecuadas de estos metales. Aunque la fortificación de los alimentos puede ser una estrategia eficaz para corregir un suministro insuficiente de hierro en la dieta, la fortificación exitosa de los alimentos con hierro sigue siendo un desafío, ya que los compuestos de hierro más utilizados en la industria alimentaria tienden a tener una baja biodisponibilidad (Hurrell, 2002; Walczyk y col., 2013). Si a esto se suma que los alimentos fortificados generalmente con alto contenido de calcio, o se consumen junto con otros alimentos son ricos en calcio, con base en los resultados presentados aquí, se puede deducir que la captación intestinal de hierro se verá afectada.

En resumen, las diferentes dinámicas de relocalización de DMT1 observadas en función de las concentraciones de Ca^{2+} y de Fe^{2+} en el compartimiento apical de las células Caco-2 polarizadas cultivadas en insertos, dejan en evidencia que efectivamente el efecto inhibitorio del calcio sobre la captación de hierro se ejerce sobre DMT1, alterando no solo la ubicación de este transportador en la célula según la concentración de calcio extracelular, sino también su capacidad de transporte de hierro desde el medio extracelular hacia los compartimientos intracelulares. Se necesitarán más esfuerzos no solo para identificar el supuesto alostérico no catalítico de DMT1 donde se une Ca^{2+} , sino también para identificar la naturaleza de las señales moleculares que mantienen secuestrado a DMT1 en la membrana apical cuando el transportado está unido a Ca^{2+} y a Fe^{2+} .

Capítulo 4: Planteamiento de un modelado matemático para describir el movimiento de DMT1 en la membrana apical de las células Caco-2 debido al efecto inhibitorio del calcio sobre el proceso de captación de hierro no hemo

Resumen

Experimentos realizados con microscopía confocal, al realizar el seguimiento de DMT1 en las células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales dejaron en evidencia que efectivamente el efecto inhibitor del calcio sobre la captación de hierro se ejerce sobre DMT1. El calcio extracelular modifica la ubicación de DMT1 en las células Caco-2, ya que mientras mayor es esta concentración de calcio, mayor es la reubicación de DMT1 hacia los dominios basales; en cambio, al reducir al mínimo esta concentración de calcio, la concentración apical de DMT1 aumenta significativamente. Además, cuando las células se exponen a hierro, la relocalización de DMT1 a los compartimientos intracelulares es más rápida cuanto menor sea la concentración de Ca^{2+} extracelular. Por lo tanto, el ciclo endocítico de DMT1 en las células Caco-2 polarizadas está determinado no sólo por la presencia de hierro en el compartimiento apical, sino también por la concentración de calcio en ese compartimiento. En este capítulo se proponen tres modelos fenomenológicos para describir el movimiento de DMT1-1A/IRE(+) en las células Caco-2 asociado a los cambios en la concentración de calcio extracelular en el medio apical y al proceso de captación de hierro no hemo. El *modelo A* sólo consideró un estado para representar la fracción de DMT1 endocitada y unida a Ca^{2+} , pero no logró representar adecuadamente los datos experimentales de la dinámica de DMT1 en la membrana apical cuando únicamente varía la concentración de Ca^{2+} extracelular. El *modelo B* acopla dos osciladores de Ball para representar el comportamiento oscilatorio de la internalización de DMT1, cuando está o no unida a Ca^{2+} , y aunque fue capaz de estimar la fracción de DMT1 ubicada en la membrana apical para todos los casos analizados, varios de los parámetros obtenidos del ajuste son negativos. El *modelo C* además de acoplar los dos osciladores de Ball como el *modelo B*, también incorpora un nuevo estado de DMT1 en la membrana apical que representa la fracción de este transportador unida tanto a hierro como a calcio. Los parámetros del *modelo C* para todos los casos son positivos y se identificaron como significativos. El *modelo C* planteado reprodujo cualitativa y cuantitativamente las principales características de la variación de la concentración de DMT1 en la membrana apical observada experimentalmente luego de modificar la concentración de calcio en el compartimiento apical de los insertos de las células Caco-2, con o sin la presencia de $10 \mu\text{M}$ de FAS. Para mejorar la predicción del modelo C en el caso donde las concentraciones de hierro y calcio en el medio apical de los insertos eran de $0 \mu\text{M}$ de FAS y 3mM de CaCl_2 , se forzó para que durante los primeros 3 minutos, sólo llevara a cabo la endocitosis de DMT1, y para que entre los minutos 3 y 11 sólo permitiera el retorno de DMT1 a la membrana, con lo cual se logró mejorar el coeficiente de determinación de $R^2 = 0,7455$ a $R^2 = 0,9523$ para el conjunto de entrenamiento del caso señalado. En resumen, se encontró que el *modelo C* planteado tiene la capacidad de representar el movimiento de DMT1-1A/IRE(+) en las células Caco-2 asociado a la presencia de diferentes concentraciones de calcio extracelular y al proceso de captación de hierro no hemo.

4.1 Introducción

Un modelo matemático es definido por [Bender \(2012\)](#) como “un constructo matemático abstracto y simplificado, que relaciona a una parte de la realidad (sistema) con un objetivo definido”. Por lo tanto, el objetivo de los modelos matemáticos es brindar una representación matemática del sistema que permita su estudio frente a situaciones que no pueden darse con facilidad en el ámbito real y resolver interrogantes que se tengan del mismo.

Para construir un modelo matemático es necesario establecer hipótesis, definir las variables, obtener datos experimentales del sistema, desarrollar las matemáticas para poder plantear el problema adecuadamente, utilizar los medios numérico/computacionales necesarios para simular el modelo, y comparar las predicciones del modelo con los datos experimentales adquiridos ([Ríos, 1995](#)). En caso de que la predicción del modelo y los datos no coincidan, deben realizarse las modificaciones necesarias hasta lograr dicha coincidencia.

Diferentes modelos matemáticos con distintos grados de eficacia pueden construirse a partir del estudio de un mismo fenómeno biológico. El proceso de absorción de hierro requiere el funcionamiento coordinado de una serie de mecanismos biológicos que interactúan de una manera altamente compleja. Debido a esta alta complejidad, el modelamiento matemático ha sido utilizado en varias ocasiones para la descripción y análisis de los componentes clave en este proceso y las interacciones entre ellos que son relevantes para recuperar el comportamiento experimental observado.

Los principales modelos reportados hasta ahora, descritos en el capítulo 1 de este manuscrito, se basan en el metabolismo del hierro a nivel sistémico o a nivel celular. Ninguno de estos modelos considera cómo la presencia de otro metal podría afectar el proceso de captación de hierro. Los modelos de [Colli y col. \(1982\)](#), [Nathanson y col. \(1984\)](#), [Lao y Kamei \(2006\)](#) y [Enculescu y col. \(2017\)](#) se centran en el metabolismo del hierro a nivel sistémico. Para el modelo de [Colins y col. \(2017\)](#) es difícil proporcionar una interpretación biológica en términos de los fenómenos relevantes involucrados en la absorción de hierro y su regulación y, además, también de la flexibilidad necesaria para expandirse fácilmente. Por otro lado, el modelo de [Cegarra y col. \(2019\)](#) aunque sí posee flexibilidad para expandirse y es interpretable biológicamente, no considera el efecto del calcio extracelular en el proceso de captación de hierro.

En el capítulo anterior de este documento se demostró que el calcio inhibe de manera no competitiva la captación de hierro mediada por DMT1 en células Caco-2, alterando no solo la ubicación de DMT1 en las células según la concentración de calcio extracelular, sino también su capacidad de transporte de hierro desde el medio extracelular hacia los compartimientos intracelulares. Esto lleva a la necesidad de plantear un modelo matemático para describir el movimiento de DMT1 asociado al proceso de captación de hierro no hemo, considerando el efecto de la presencia o ausencia de calcio extracelular en la dinámica del transportador.

En este capítulo se proponen modelos fenomenológicos basados en estados que tiene en cuenta los principales componentes biológicos de este sistema, para estudiar el movimiento de DMT1 durante proceso de captación de hierro no hemo en células Caco-2, en presencia de diferentes concentraciones de calcio extracelular. Los modelos consideran una descripción de los estados de DMT1 y su internalización, con el fin de capturar la compleja dinámica de relocalización de DMT1 observada experimentalmente.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Solución del problema inverso

Para demostrar que el modelo propuesto es capaz de predecir el movimiento de DMT1 durante el proceso de captación de hierro de las células Caco-2 ante diferentes concentraciones de calcio extracelular, es decir, que puede representar los datos experimentales de este proceso, es necesario evaluar la calidad del modelo.

Cuando los datos experimentales no pueden obtenerse fácilmente, la cantidad de datos disponibles para resolver el problema inverso y ajustar los parámetros de un modelo puede ser limitada. En estos casos, la posibilidad de sobreajuste es muy clara ya que el número de puntos experimentales se acerca o supera el número de parámetros del modelo (Priddy y col., 2005). Los métodos de remuestreo son comúnmente utilizados para validar los modelos propuestos, y consisten en métodos originalmente utilizados para la estimación de parámetros que no poseen una distribución teórica previa (Viera y col., 2010). Los más usados son: *Bootstrap*, Validación Cruzada y *Jackknife* (o validación cruzada dejando uno por fuera) (Efron, 1982).

En esta investigación el método a utilizar para validar el modelo fenomenológico propuesto será la validación cruzada dejando uno fuera (*leave-one-out cross-validation*) o la técnica *Jackknife*, debido a que es el método de remuestreo más utilizado para tratar con datos experimentales limitados y generalmente aproxima mejor los valores estadísticos en comparación con los otros métodos (Priddy y col., 2005; Rao y col., 2008). La técnica de estimación de parámetros *Jackknife* es un proceso iterativo, que se repite tantas veces como el número de observaciones experimentales disponibles (N) (Abdi y Williams, 2010). Los parámetros del modelo se ajustan al conjunto de datos de entrenamiento experimental minimizando el error cuadrático medio (MSE : *Mean Square Error*) entre el elemento omitido y el valor predicho usando el modelo con los nuevos parámetros encontrados del ajuste, utilizando el algoritmo simplex de Nelder-Mead (Lagarias y col., 1998). Al final del proceso iterativo se obtiene una estimación del error de generalización, dada por el MSE de *Jackknife* (MSE_{jk}), que se define como la suma de las diferencias entre el valor experimental eliminado en cada iteración (Y_i) y el valor predicho (\widehat{Y}^{-l_i}) por el modelo (ecuación 4.1) (Salkind, 2010).

$$MSE_{jk} = \sum_{i=1}^N |\widehat{Y}^{-l_i} - Y_i| \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

Debe considerarse que este método es más costoso computacionalmente ya que debe ajustar el modelo N veces; por ello, sólo se utiliza cuando el conjunto de datos experimentales disponibles tanto para el entrenamiento como para las pruebas es reducido, lo que ayuda a evitar el sobreajuste (Rao y col., 2008).

Con el método de *Jackknife* también se pueden calcular los pseudo-parámetros por medio de la ecuación 4.2, donde a_k^* es valor del pseudo-parámetro, a_k es el valor del k -ésimo parámetro ajustado con todos los datos de entrenamiento minimizando el MSE , y $a_{i,k}$ es el valor del k -ésimo parámetro obtenido al retirar el valor experimental Y_i . Los valores de los pseudo-parámetros pueden ser utilizados para determinar los parámetros de interés, ya que corresponden a un estimador no sesgado de los parámetros obtenidos en la etapa de ajuste.

$$a_k^* = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (N \cdot a_k - (N-1) \cdot a_{i,k}) \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

Por otro lado, la desviación estándar de los pseudo-parámetros puede emplearse para estimar los intervalos de confianza de los parámetros analizados según la ecuación 4.3, donde $t_{\alpha,v}$ es el valor t de Student para un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ y v grados de libertad $(N - k)$, y $\hat{\sigma}_{a_k^*}$ es el error estándar del pseudo-parámetro a_k^* , dado en la ecuación 4.4.

$$IC(a_k^*) = a_k^* \pm t_{\alpha,v} \cdot \hat{\sigma}_{a_k^*} \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

$$\hat{\sigma}_{a_k^*} = \sqrt{\frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^N ((N \cdot a_k - (N-1) \cdot a_{i,k}) - a_k^*)^2} \quad (\text{Ecuación 4.4})$$

Para validar fenomenológicamente el modelo propuesto, y así cumplir con el último objetivo de esta investigación, debe disponerse de un conjunto de datos experimentales diferente al utilizado para realizar el ajuste de los parámetros del modelo. Estos se conocen como conjunto de evaluación y conjunto de entrenamiento del modelo. El conjunto de entrenamiento está conformado por los datos experimentales obtenidos para: (i) 4 células cuando sólo se varía la concentración de calcio extracelular sin agregar hierro FAS, (ii) 3 células cuando el desafío de hierro en el compartimiento apical se realiza en presencia de diferentes concentraciones de calcio. El conjunto de evaluación o validación está conformado por los datos experimentales obtenidos para 3 células en todos los casos. Los parámetros del modelo se obtienen minimizando el MSE para el conjunto de evaluación. Los datos experimentales del conjunto de entrenamiento se utilizaron para validar fenomenológicamente el modelo propuesto.

Se ha demostrado que el coeficiente de determinación R^2 es una medida inadecuada para la bondad de ajuste en modelos no lineales, ya que las diferencias en la calidad del modelo rara vez afectan su valor más que en el tercer al quinto lugar decimal (Spiess, 2010; McElreath, 2016; Taddy, 2019). El criterio de información de Akaike (AIC) es una medida ampliamente aceptada para determinar la validez dentro de una cohorte de modelos no lineales y formula el problema de selección del modelo como una búsqueda del modelo con el valor AIC más bajo, cuantificando simultáneamente la precisión y la simplicidad del modelo, es decir, AIC se ocupa tanto del riesgo de sobreajuste como del riesgo de desajuste (Burnham y Anderson, 2002; Martínez y col., 2007; Martínez y col., 2009). El valor del AIC de un modelo es el siguiente:

$$AIC = 2 \cdot p - 2 \ln(L) \quad (\text{Ecuación 4.5})$$

donde p es el número de parámetros del modelo y L es la función de verosimilitud para el modelo. El AIC no es una prueba del modelo en el sentido de la prueba de hipótesis, sino que es una prueba entre los modelos, es decir, es una herramienta para la selección del modelo.

Cuando el tamaño de la muestra es pequeño, existe una probabilidad sustancial de que AIC seleccione modelos que tengan demasiados parámetros (Ronchetti y col., 2000; Claeskens y Hjort, 2008; Giraud, 2021). Para abordar este posible sobreajuste, se desarrolló una corrección para tamaños de muestra pequeños llamada criterio de información de Akaike

corregido por sesgo (AICc), que es esencialmente AIC con un término de penalización adicional para el número de parámetros, el cual viene dado por:

$$AIC_c = AIC + \frac{2 \cdot p(p + 1)}{N - p - 1} \quad (\text{Ecuación 4.6})$$

donde N es el tamaño de la muestra de datos.

En este trabajo, evaluamos los modelos utilizando el criterio de información de Akaike corregido por sesgo (AICc) ya que se tiene un bajo número de mediciones experimentales. El modelo con menor AICc se selecciona como el modelo más adecuado para caracterizar los datos experimentales.

4.2.2 Detalles de la simulación

Las condiciones iniciales para cada modelo se indican en cada caso. La estimación inicial de los parámetros que se utilizará para dar partida al algoritmo de optimización asociado al proceso de ajuste de parámetros generalmente se obtiene de un estudio preliminar del comportamiento del modelo cualitativo. Todos los cálculos y simulaciones se realizarán utilizando MATLAB® (MATLAB, 1998).

4.2.3 Consideraciones para la construcción del Modelo Fenomenológico

Para la generación de un modelo capaz de proporcionar una interpretación biológica en términos de los fenómenos relevantes involucrados en la absorción de hierro y su regulación, que considere el efecto del calcio en el proceso y que además posea la flexibilidad necesaria para expandirse fácilmente, se optó por el desarrollo de un modelo de tipo fenomenológico para describir el movimiento de DMT1-1A/IRE(+) en las células Caco-2 asociado al proceso de captación de hierro no hemo y a la variación de la concentración de calcio extracelular.

Dada la complejidad del proceso en estudio y en base a la evidencia experimental obtenida, se realizaron supuestos que permitieron simplificar el problema, seleccionando los componentes y fenómenos más relevantes para describir el proceso.

- la actividad de DcytB puede ignorarse ya que se usó hierro en forma de FAS y recién preparado;
- el transporte de Fe^{2+} facilitado por DMT1 está desacoplado de la concentración de H^+ , debido a que el pH de los medios utilizados en todos los experimentos tiene un valor cercano a 7;
- teniendo en cuenta la escala de tiempo de los experimentos desarrollados, los mecanismos de regulación sistémica, transcripcional y traslacional no afectan el sistema;
- los flujos de hierro desde célula al medio apical no se consideran debido a la presencia reducida de transferrina (Tf), ya que 24 horas antes de los experimentos las células se incubaron en medio con 2 % de SBF y los experimentos se realizaron en medio sin SBF;
- la actividad de FPN1 no se considera significativamente diferente ante las diferentes concentraciones de calcio estudiadas, durante los primeros 30 minutos de experimentación.

Hasta ahora, no se ha informado la cantidad de DMT1 presente en una célula Caco-2 promedio, pero se supondrá que es constante considerando la escala de tiempo experimental manejada en este trabajo (Nuñez, 2010). Los modelos propuestos no consideran directamente la concentración de DMT1 sino una concentración efectiva del transportador $DMT1_{Eff}$ que forma parte del conjunto de parámetros del modelo, y corresponde al cociente de la concentración del transportador (DMT1) y la efectividad del ciclo de transporte del modelo φ , $[DMT1_{Eff}^{Modelo}] = DMT1/\varphi_{Modelo}$. El factor φ representa la efectividad del transporte de hierro y es característico de la estructura matemática de cada modelo.

Como no se conocen las bases moleculares del fenómeno en estudio, no es posible determinar las velocidades de cada una de las transiciones entre los estados del modelo a través de técnicas experimentales. Por ello, el conjunto de parámetros de cada modelo a plantear debe ajustarse al conjunto de datos de entrenamiento minimizando el error cuadrático medio empleando la técnica de *Jackknife* descrita en la sección 4.2.1 de este capítulo. Luego, utilizando el conjunto de datos experimentales de validación debe evaluarse la calidad del modelo ajustado, a través de la comparación las predicciones obtenidas por medio de la simulación del modelo con los resultados experimentales. Esto permitirá validar cada modelo matemático propuesto.

Para incorporar las variaciones de DMT1 en la membrana apical en el tiempo, es necesario considerar el proceso de endocitosis de estos transportadores. Sin embargo, la poca información disponible sobre ese proceso llevó al planteamiento de diferentes maneras de representar la endocitosis de DMT1, utilizando la información experimental obtenida en los capítulos anteriores. Así, se implementaron los modelos más factibles y se realizó un ajuste de parámetros con cada uno de ellos. Finalmente, se analizaron los resultados obtenidos en las simulaciones de cada modelo, comparando sus resultados estadísticos y sus desempeños al simular el movimiento de DMT1 apical al cambiar la concentración de calcio extracelular, con o sin la presencia de $10 \mu M$ de FAS.

4.3 Construcción del Modelo fenomenológico

4.3.1 Modelo A

Una primera aproximación para lograr el planteamiento del modelo fenomenológico deseado que represente cualitativa y cuantitativamente la variación de la concentración de DMT1 en la membrana apical observada experimentalmente luego de modificar la concentración de calcio en el compartimiento apical de los insertos, con o sin la presencia de hierro, se presenta en la [Figura 4.1](#). En este modelo, P_i corresponde a la fracción de DMT1 en el estado i , y k_{ij} es la constante cinética asociada a la transición entre los estados i y j . La concentración de hierro en el espacio intracelular-basolateral y la concentración de hierro apical se denotan por Fe_{IN}^{2+} y Fe_{OUT}^{2+} respectivamente.

En este modelo, cuando DMT1 está vacío y orientado hacia el lado apical (P_1) puede unirse a Fe^{2+} ($P_1 \rightarrow P_2$), y esta unión al hierro ocurre en el estado de alto pKa de DMT1. Después de que DMT1 se une al hierro, se produce un cambio conformacional casi inmediatamente que lleva al transportador a un estado ocluido de apertura interna, donde DMT1 se rota a una conformación bajo en pKa ($P_2 \rightarrow P_3$). El hierro se solvata y deja el sitio de unión de DMT1 para formar parte del cLIP ($P_3 \rightarrow P_4$), y DMT1 recupera el estado abierto de alta afinidad hacia el exterior ($P_4 \rightarrow P_1$). En este ciclo ($P_1 \rightarrow P_2 \rightarrow P_3 \rightarrow P_4$) sólo considero

reversible la transición $P_1 \rightarrow P_4$, teniendo en cuenta que la concentración de hierro en el espacio intracelular cerca de la membrana apical es demasiado baja para permitir una interacción con DMT1 (Pujol-Giménez y col., 2017). Además, para capturar la naturaleza de la relocalización de DMT1 desde la membrana apical a dominios intracelulares en vesículas luego de exponer a las células a un desafío de hierro y su posterior retorno a la membrana (Nuñez, 2010; Esparza y col., 2015), se acopló el modelo del oscilador de Ball a través del estado P_4 y, mientras DMT1 esté en la membrana de la vesícula y no esté unido a Ca^{2+} , puede liberar hierro de la vesícula al cLIP. Aunque la internalización de DMT1 libre o unido a hierro podría ocurrir para cualquiera de los estados P_1, P_2, P_3 o P_4 de DMT1 de la Figura 4.1, el modelo considera la internalización de P_4 como representativa de este proceso. En este escenario, los compuestos *A, B* y *C* del oscilador de Ball corresponden a los estados P_4, P_5 y P_6 en el modelo propuesto. Por otro lado, es importante destacar que para que ocurra el comportamiento oscilatorio esperado, inicialmente, la fracción de DMT1 en las especies P_5 y P_6 debe ser diferente de cero.

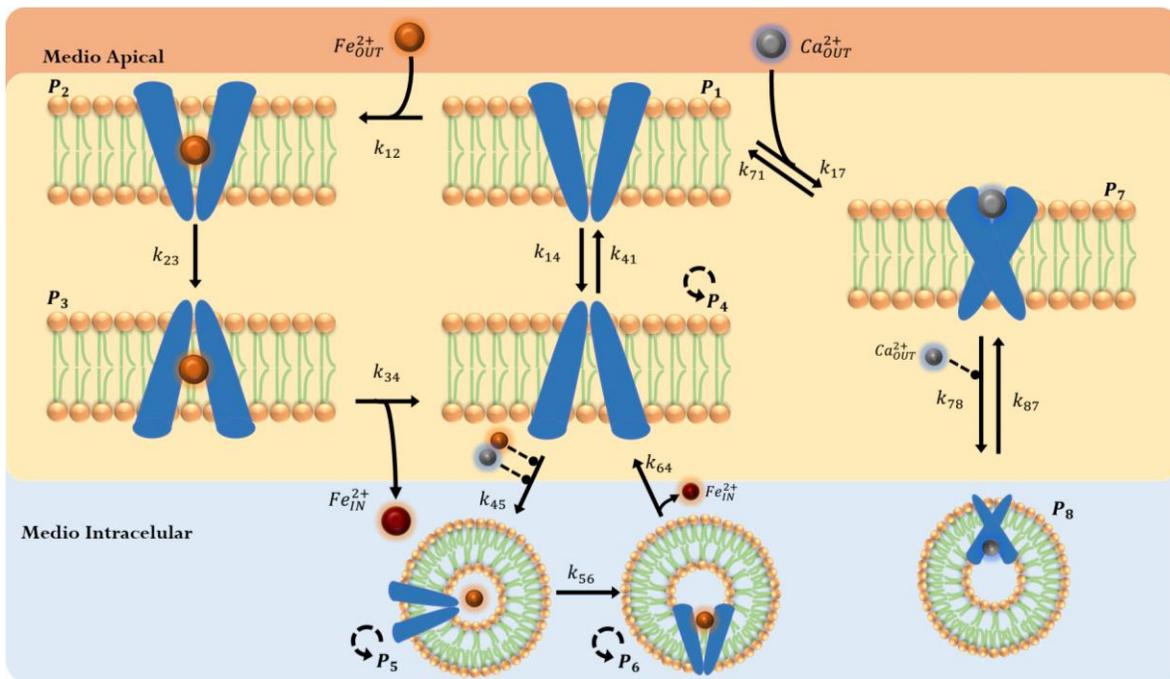


Figura 4.1. Modelo A. DMT1 en la membrana apical no unida a hierro ni a calcio y orientada hacia el lado apical (P_1), puede unirse al calcio del medio extracelular cambiando su conformación a un estado donde no puede transportar hierro (P_7), desde donde DMT1 puede ser endocitado en vesículas permaneciendo en un estado es incapaz de liberar hierro al citosol (P_8). Circulo naranja: concentración de hierro extracelular ($\text{Fe}_{\text{OUT}}^{2+}$); círculo marrón: concentración de hierro en el espacio intracelular-basolateral ($\text{Fe}_{\text{IN}}^{2+}$); círculo gris: concentración de calcio extracelular ($\text{Ca}_{\text{OUT}}^{2+}$). El hierro y el calcio extracelular se consideran factores reguladores en la endocitosis, representados como una flecha moduladora discontinua ($--\bullet$). Las reacciones autocatalíticas de los estados P_4, P_5 y P_6 están representadas por una flecha moduladora circular discontinua (\cdots).

Los estados P_7 y P_8 representan la fracción de DMT1 unida a Ca^{2+} en la membrana apical y endocitada, respectivamente. Se asumió que el transportador sólo puede unirse a Ca^{2+} , posiblemente en un sitio alostérico, mientras DMT1 está vacío y orientado hacia el medio extracelular (P_1), lo cual origina un cambio conformacional del transportador (P_7) que

le impide transportar Fe^{2+} . El calcio unido a DMT1 también puede modificar la localización de este transportador, haciendo que se internalice en vesículas (P_8) desde las cuales DMT1 no podrá transportar hierro, pero tampoco podrá liberar el calcio que tiene unido hacia el citoplasma, pues según lo reportado en literatura (Shawki y Mackenzie, 2010), DMT1 no es capaz de transportar Ca^{2+} al interior de las células, en presencia o ausencia de hierro. Sólo cuando DMT1 se encuentra en la membrana apical, su unión con calcio se puede escindir, y el transportador retorna a un estado vacío ($P_7 \rightarrow P_1$) desde el cual puede: unirse a Fe^{2+} y transportarlo al citoplasma o volver a unirse a Ca^{2+} . Considerando que DMT1 puede endocitarse y luego fusionarse nuevamente a la membrana apical, se planteó que la reacción $P_7 \rightarrow P_8$ sea reversible. Además, por simplificación, se supuso que DMT1 unido al Ca^{2+} no presenta cambios conformacionales en la membrana (P_7) ni endocitado (P_8), ya que es posible que DMT1 presente diferentes configuraciones cuando está unido a calcio, pero se optó inicialmente por mantener la propuesta lo más acotada posible para no agregar más reacciones y ni parámetros que actualmente se desconocen.

Las variaciones en la concentración de DMT1 en la membrana apical cuando las células no son desafiadas con hierro deben representarse casi en su totalidad a través de variaciones en el estado endocitado P_8 , que a su vez proviene de la variación de la suma de los estados P_1 , P_4 y P_7 en la membrana, ya que en el compartimiento apical de los insertos no hay hierro disponible para transportar y sólo el hierro intracelular sería el capaz de producir pequeños cambios en los estados P_5 y P_6 de DMT1. En esta propuesta, Ca^{2+} puede modular la función de DMT1 localizada tanto en las vesículas como en la membrana apical, lo que puede explicar el efecto del calcio en la absorción de hierro no hemo y hemo, pues se ha reportado que la liberación del hierro hemo en el citosol también está mediada por DMT1 (Zhang y Enns, 2008; Yanatori y col., 2017).

La variación de la concentración de calcio en el medio extracelular y del calcio libre citosólico, en respuesta a las condiciones experimentales analizadas no se abordaron en este trabajo. Diversos modelos propuestos para representar la concentración de calcio citosólico (Wiesner y col., 1997; Lecourieux y col., 2002; Appleby y col., 2013; Mingzhu y col., 2021) incluyen información de la estimulación de agonistas, de los coeficientes de degradación y de producción del inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), de las distancias entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias, entre otras características, de las cuales no se posee información para las células Caco-2 cultivadas en insertos, cuando se someten a variaciones en la concentración de calcio extracelular apical. Sin embargo, en estos modelos se expone que, cuando sólo la concentración de calcio extracelular aumenta, las células exhiben una elevación sostenida en la concentración de calcio citosólico hasta alcanzar el equilibrio, sin la presencia de una elevación drástica (*peak*) inicial, semejante a una cinética de primer orden. En la Figura 2.2 presentada en el Capítulo 2 de este trabajo, antes de la adición de tapsigargina (TAP), se puede observar que la variación de la fluorescencia de Fluo-3 (indicador de la concentración de Ca^{2+} intracelular) podría describirse con un modelo lineal, pero, luego de la adición de TAP sin preincubación con BAPTA, se observa una elevación sostenida en la fluorescencia de Fluo-3, como la reportada en los diversos modelos propuestos para la concentración de calcio citosólico.

Considerando que el mecanismo que permite la variación de la concentración extracelular del calcio, en función de la variación citosólica del calcio, no se comprende completamente para las condiciones experimentales específicas analizadas en este trabajo, y que no depende de DMT1 ya que este no transporta Ca^{2+} , se propone un balance de materia en régimen transitorio asumiendo que el calcio no se genera ni se consume, es decir, que la

variación de la concentración de calcio en medio apical se debe a su entrada y su salida de dicho medio. Por lo tanto, la ecuación cinética de primer orden que permite modelar dicho balance viene dada por:

$$\begin{aligned}\frac{dCa_{OUT}^{2+}}{dt} &= Entrada_Ca_{OUT}^{2+} - Salida_Ca_{OUT}^{2+} \\ \frac{dCa_{OUT}^{2+}}{dt} &= k_{inCa} \cdot Ca_{OUT}^{2+} - k_{outCa} \cdot Ca_{OUT}^{2+}\end{aligned}\quad (Ecuación 4.7)$$

Las ecuaciones del *Modelo A* corresponden las ecuaciones diferenciales derivadas de los balances de masa para todas las especies de la [Figura 4.1](#), bajo el supuesto de que todas las reacciones en el mecanismo son elementales, y se presentan a continuación:

$$\frac{dP_1}{dt} = -k_{12}P_1Fe_{OUT}^{2+} - k_{14}P_1 + k_{41}P_4 - k_{17}P_1Ca_{OUT}^{2+} + k_{71}P_7 \quad (Ecuación 4.8)$$

$$\frac{dP_2}{dt} = k_{12}P_1Fe_{OUT}^{2+} - k_{23}P_2 \quad (Ecuación 4.9)$$

$$\frac{dP_3}{dt} = k_{23}P_2 - k_{34}P_3 \quad (Ecuación 4.10)$$

$$\frac{dP_4}{dt} = k_{34}P_3 + k_{14}P_1 - k_{41}P_4 + k_{64}P_6P_4 - (k_{45}Fe_{OUT}^{2+}Ca_{OUT}^{2+})P_4P_5 \quad (Ecuación 4.11)$$

$$\frac{dP_5}{dt} = (k_{45}Fe_{OUT}^{2+}Ca_{OUT}^{2+})P_4P_5 - k_{56}P_5P_6 \quad (Ecuación 4.12)$$

$$\frac{dP_6}{dt} = k_{56}P_5P_6 - k_{64}P_6P_4 \quad (Ecuación 4.13)$$

$$\frac{dP_7}{dt} = k_{17}P_1Ca_{OUT}^{2+} - k_{71}P_7 + k_{87}P_8 - (k_{78}Ca_{OUT}^{2+})P_7 \quad (Ecuación 4.14)$$

$$\frac{dP_8}{dt} = -k_{87}P_8 + (k_{78}Ca_{OUT}^{2+})P_7 \quad (Ecuación 4.15)$$

$$\frac{dFe_{IN}^{2+}}{dt} = k_{34}DMT1_E P_3 + \gamma k_{64}DMT1_E P_6 \quad (Ecuación 4.16)$$

$$\frac{dFe_{OUT}^{2+}}{dt} = -\frac{V_{cb}}{V_a} \cdot \frac{dFe_{IN}^{2+}}{dt} \quad (Ecuación 4.17)$$

$$\frac{dCa_{OUT}^{2+}}{dt} = k_{inCa} \cdot Ca_{OUT}^{2+} - k_{outCa} \cdot Ca_{OUT}^{2+} \quad (Ecuación 4.18)$$

Las ecuaciones 4.8 a la 4.10 se obtienen directamente aplicando la ley de acción de masas para todas las transiciones que involucran estos estados. En las ecuaciones 4.11 y 4.12, el término $(k_{45}Fe_{OUT}^{2+}Ca_{OUT}^{2+})$ explica la endocitosis de DMT1 que ocurre por la presencia de hierro y de calcio en el medio apical y, por lo tanto, evita que el modelo presente oscilaciones aunque no exista hierro o calcio en el medio. Por otro lado, el término $(k_{78}Ca_{OUT}^{2+})$ en las ecuaciones 4.14 y 4.15, explica la endocitosis de DMT1 que ocurre sólo por la presencia de calcio en el medio apical. El término $k_{64}P_6P_4$ en las ecuaciones 4.11 y 4.13 explica el retorno de DMT1 a la membrana apical que, como en el caso del oscilador de Ball, solo puede ocurrir

si los estados P_4 y P_6 son distintos de cero. La ecuación 4.17 se obtiene aplicando la conservación de la masa.

La ecuación 4.16 representa la captación de hierro en el espacio intracelular y basolateral, como resultado del transporte directo de Fe^{2+} por DMT1 en la transición $P_3 \rightarrow P_4$, y de liberación de hierro desde las vesículas que están fusionadas con endosomas tardíos (Yanatori y col., 2017). La liberación de Fe^{2+} al citosol desde las vesículas está representada por el término $\gamma k_{64} DMT1_E P_6$, donde $k_{64} DMT1_E P_6$ es la tasa máxima de liberación de hierro asociada a los transportadores endocitados, y γ es un factor de corrección de volumen que tiene en cuenta las vesículas que contienen DMT1 que pueden transportar hierro a los medios intracelulares. Este factor de corrección se estima como la relación entre el volumen de vesículas que contienen DMT1 que son capaces de liberar hierro ($V_V = 2,5 \cdot 10^{-10} \mu L$) y la suma de los volúmenes intracelular y basolateral ($V_{cb} = 200 \mu L$) (Cegarra y col. 2019).

La técnica de validación cruzada dejando uno fuera (LOOCV) o Jackknife, descrito en el Capítulo 2 de este manuscrito, fue el método de remuestreo utilizado para ajustar los parámetros del *Modelo A* al conjunto de datos de entrenamiento experimental. Los quince parámetros de este modelo se ajustaron utilizando como conjunto de entrenamiento los datos experimentales obtenidos para: (i) 4 células cuando sólo se varía la concentración de calcio extracelular sin agregar hierro FAS, y para (ii) 3 células cuando el desafío de hierro en el compartimiento apical se realiza en presencia de diferentes concentraciones de calcio. El conjunto de validación para cada concentración de Ca^{2+} , con o sin FAS, está consituido por los datos experimentales obtenidos para 3 células.

El número de observaciones experimentales (N) para cada condición experimental fue:

- Para $0 \mu M$ de FAS y $10 \mu M$ de $CaCl_2$, $N = 54$ para el conjunto de entrenamiento y $N = 39$ para el conjunto de validación;
- Para $0 \mu M$ de FAS y $1,5 mM$ de $CaCl_2$, $N = 41$ para el conjunto de entrenamiento y $N = 29$ para el conjunto de validación;
- Para $0 \mu M$ de FAS y $3 mM$ de $CaCl_2$, $N = 60$ para el conjunto de entrenamiento y $N = 45$ para el conjunto de validación;
- Para $10 \mu M$ de FAS y $10 \mu M$ de $CaCl_2$, $N = 45$ para el conjunto de entrenamiento y $N = 42$ para el conjunto de validación;
- Para $10 \mu M$ de FAS y $1,5 mM$ de $CaCl_2$, $N = 25$ para el conjunto de entrenamiento y $N = 25$ para el conjunto de validación;
- Para $10 \mu M$ de FAS y $3 mM$ de $CaCl_2$, $N = 39$ para el conjunto de entrenamiento y $N = 38$ para el conjunto de validación.

Las condiciones iniciales de las fracciones de DMT1 se establecieron considerando los datos experimentales y teniendo en cuenta que los experimentos se realizan en medios libres de suero y con la mínima concentración extracelular de calcio. Las condiciones iniciales para el *modelo A* se establecieron como $Fe_{IN}^{2+}=0 \mu M$, $Fe_{OUT}^{2+}(0)=0$ o $10 \mu M$, $Ca_{OUT}^{2+}(0)=10 \mu M$, $1,5 mM$ o $3 mM$, $P_1(0) = 0,20$, $P_2(0) = P_3(0) = P_4(0) = 0$, $P_5(0) = 0,25$, $P_6(0) = 0,20$, $P_7(0) = 0,10$, $P_8(0) = 0,25$. Todos los cálculos y simulaciones se realizaron con un integrador comercial que utiliza los métodos de integración numérica de la familia Runge-Kutta. (Shampine, 1986).

Usando los datos experimentales del conjunto de entrenamiento, se ajustó cada uno de los parámetros del *Modelo A* a un valor constante que permitiría que el modelo

representara la variación de la concentración de DMT1 en la membrana apical para cada concentración de calcio utilizada, con o sin FAS. Sin embargo, el modelo no captura la dinámica del sistema para cada condición experimental estudiada a través de un único conjunto de parámetros.

Luego de ajustar los parámetros del modelo de manera global mediante la técnica de Jackknife, se encontró que los valores obtenidos para cada parámetro son cercanos, excepto los valores de k_{45} , k_{64} , k_{17} , k_{71} , k_{78} y k_{87} , que varían significativamente para cada condición experimental analizada. Así, se ajustaron los parámetros k_{45} , k_{64} , k_{17} , k_{71} , k_{78} y k_{87} para cada condición experimental de forma independiente, manteniendo los valores encontrados en el primer ajuste para el resto de parámetros. Los valores de los parámetros así obtenidos se presentan en la sección A.5.1 de Anexos.

Las simulaciones del *Modelo A* para el comportamiento de DMT1 en la membrana apical a lo largo del tiempo, ante las diferentes concentraciones de calcio en el medio apical ($10 \mu\text{M}$, $1,5 \text{ mM}$ o 3 mM de Ca^{2+}), con o sin un desafío de $10 \mu\text{M}$ de FAS en el medio apical de las células, se realizaron utilizando los parámetros obtenidos del ajuste para el conjunto de entrenamiento experimental, y se muestran en la [Figura 4.2](#), en la cual se comparan el promedio de los datos experimentales de cada caso con su respectiva simulación. Los resultados de la simulación en la [Figura 4.2](#) muestran que el modelo tiene la capacidad de representar la relocalización de DMT1 cuando las células Caco-2 se desafían con $10 \mu\text{M}$ de FAS en el medio apical en presencia de cualquiera de las tres concentraciones de calcio utilizadas ([Figura 4.2 C, D y E](#)); además, los coeficientes de determinación obtenidos de esta simulación cuando en el medio apical de los insertos habían $10 \mu\text{M}$ de FAS y $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 , $10 \mu\text{M}$ de FAS y $1,5 \text{ mM}$ de CaCl_2 , y $10 \mu\text{M}$ de FAS y 3 mM de CaCl_2 fueron $R^2 = 0,9649$, $R^2 = 0,8554$, y $R^2 = 0,9752$, respectivamente. Sin embargo, el modelo no logra representar adecuadamente los datos experimentales de la dinámica de DMT1 en la membrana apical cuando únicamente varía la concentración de Ca^{2+} extracelular, sin la adición de hierro, lo cual se evidencia tanto en las [Figuras 4.2 A, B y C](#) como en los coeficientes de determinación obtenidos para estos casos, que son $R^2 = 0,6258$, $R^2 = 0,8688$, y $R^2 = 0,7601$, respectivamente.

Para el ajuste de parámetros obtenido cuando en el medio apical de los insertos habían $0 \mu\text{M}$ de FAS y $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 , se obtuvo que el parámetro k_{71} es negativo, lo cual no tiene sentido biológico. Este valor negativo de k_{71} indica que el modelo cambia la dirección de la transición de estados $P_7 \rightarrow P_1$ por $P_1 \rightarrow P_7$, aumentando así la concentración de DMT1 en el estado P_7 , y así tener mayor control de la concentración de DMT1 en membrana y endocitada. Por otro lado, se obtuvo que el parámetro k_{64} es negativo para el ajuste de parámetros obtenido cuando en el medio apical de los insertos habían $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 y 0 o $10 \mu\text{M}$ de FAS, indicando que el modelo en estos casos busca mantener a DMT1 encocitado ya que k_{64} está asociado al retorno a la membrana apical de DMT1 encocitado en el oscilador de Ball.

Esta capacidad limitada del modelo para representar los casos presentados en las [Figuras 4.2 A, B y C](#) se debe a que el modelo no puede representar oscilaciones en los estados P_7 y P_8 . Para lograr esto, una de las representaciones matemáticas más simples, es forzar el cambio de las constantes de velocidad de la reacción $P_7 \leftrightarrow P_8$ en el tiempo. Sin embargo, teniendo en cuenta que esto implicaría definir los instantes de tiempo donde sólo se produciría la endocitosis de DMT1 ($P_7 \rightarrow P_8$) o su retorno a la membrana apical ($P_8 \rightarrow P_7$), y considerando la falta de conocimiento sobre cómo el calcio induce la relocalización de DMT1, a continuación, se presenta un nuevo modelo que buscará que la fracción de DMT1 unida a Ca^{2+} , tanto en la membrana apical como endocitada, pueda oscilar.

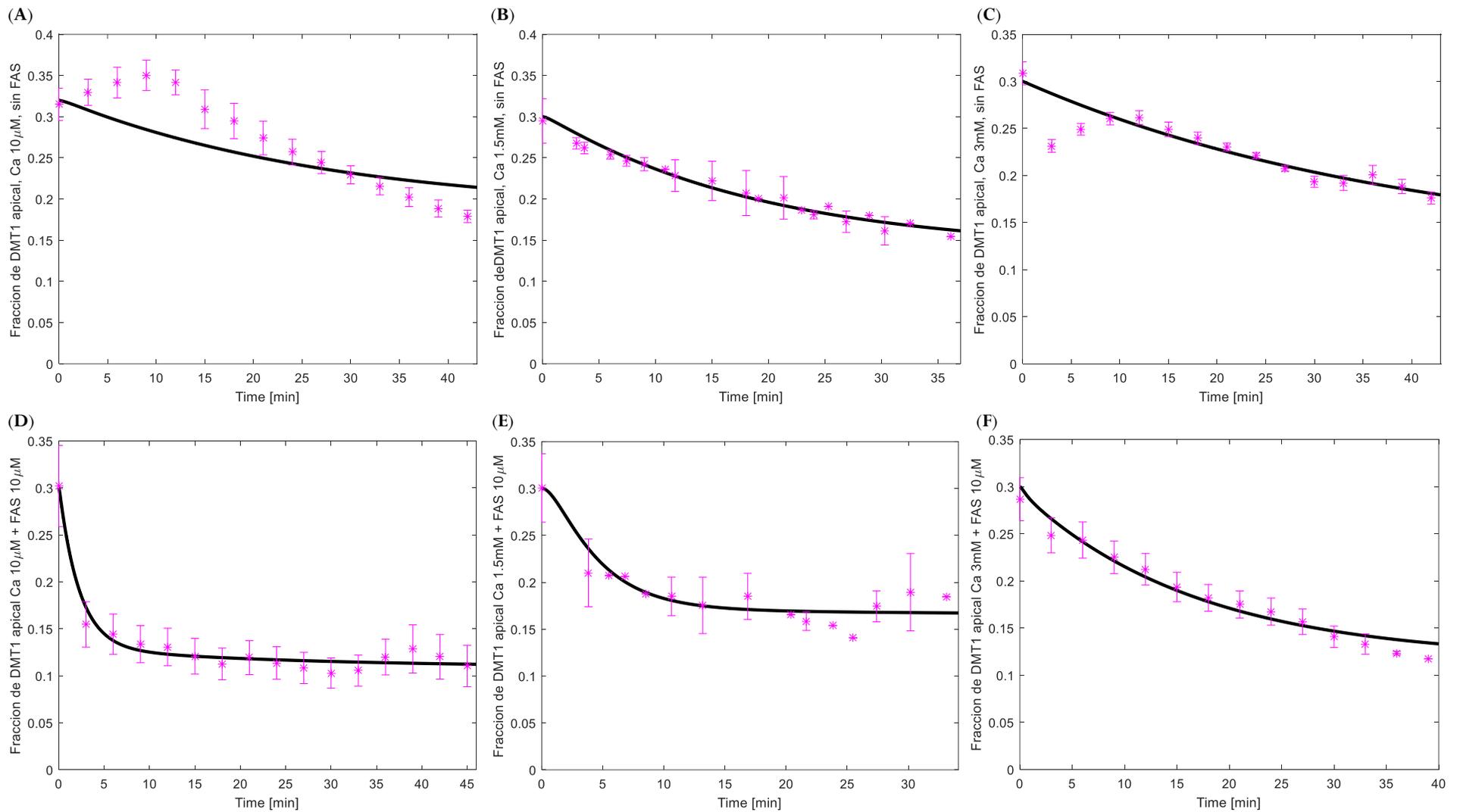


Figura 4.2. Simulación del Modelo A. Simulación del modelo (curvas negras) y datos experimentales (* rosados) de la fracción de DMT1 en la membrana apical ($P_1 + P_2 + P_3 + P_4 + P_7$) después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por: **(A)** 10 μM de CaCl_2 y 0 μM de FAS, **(B)** 1,5 mM de CaCl_2 y 0 μM de FAS, **(C)** 3 mM de CaCl_2 y 0 μM de FAS, **(D)** 10 μM de CaCl_2 y 10 μM de FAS, **(E)** 1,5 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS, **(F)** 3 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS. Los asteriscos corresponden al valor promedio de las muestras del conjunto de entrenamiento y las barras de error indican su desviación estándar.

4.3.2 Modelo B

Una nueva alternativa para representar la relocalización de DMT1 desde la membrana apical a dominios intracelulares, dependiente únicamente de la concentración de Ca^{2+} en el medio apical, consiste en acoplar otro oscilador de Ball a través del estado P_7 donde, mientras DMT1 esté en la membrana de la vesícula, no podrá liberar hierro al cLIP ya su endocitosis ocurre cuando está unido a Ca^{2+} . Se considera la internalización de P_7 como representativa del proceso de endocitosis de DMT1 unida a calcio. Los estados P_7 , P_8 y P_9 en el *Modelo B* propuesto corresponden a los compuestos *A*, *B* y *C* del oscilador de Ball. El *Modelo B* propuesto se presenta en la [Figura 4.3](#). Como puede observarse, el resto del modelo se mantuvo igual al *Modelo A*, y la única variación fue el acoplamiento de un nuevo oscilador de Ball desde el estado P_7 .

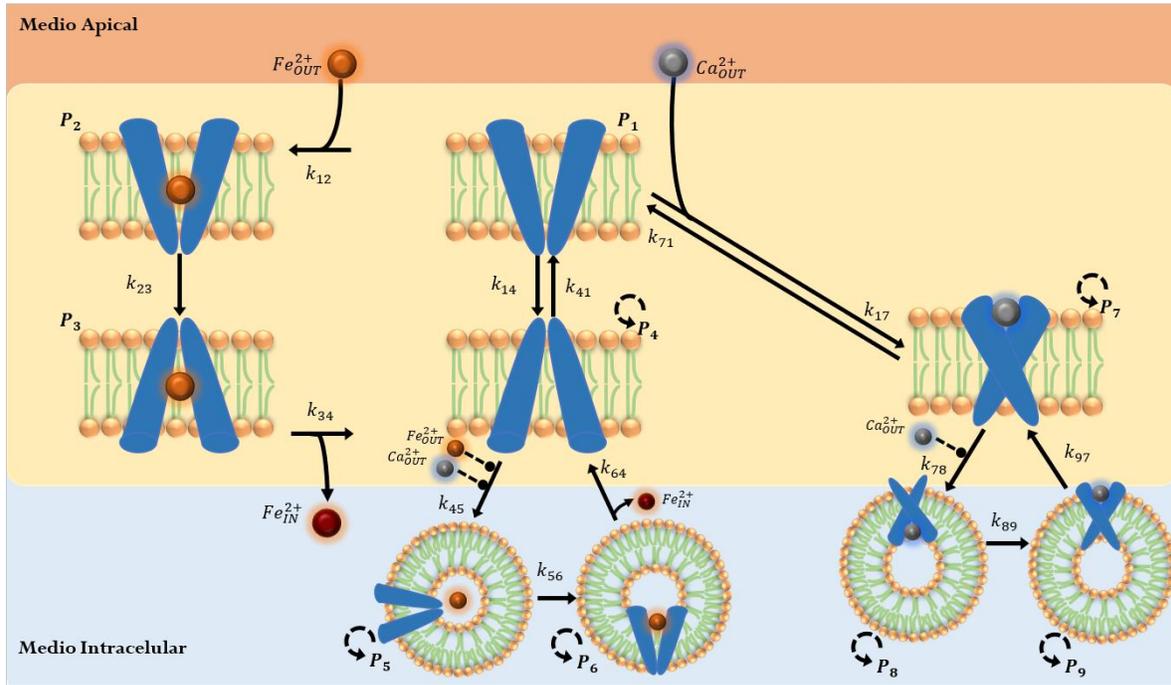


Figura 4.3. Modelo B. DMT1 en la membrana apical no unida a hierro ni a calcio y orientada hacia el lado apical (P_1), puede unirse al calcio del medio extracelular cambiando su conformación a un estado donde no puede transportar hierro (P_7), y DMT1 unido a calcio puede ser endocitado en vesículas (P_8), desde donde podrá cambiar su conformación para retornar a la membrana (P_9). Circulo naranja: concentración de hierro extracelular (Fe_{OUT}^{2+}); círculo marrón: concentración de hierro en el espacio intracelular-basolateral (Fe_{IN}^{2+}); círculo gris: concentración de calcio extracelular (Ca_{OUT}^{2+}). El hierro y el calcio extracelular se consideran factores reguladores en la endocitosis, representados como una flecha moduladora discontinua ($--\bullet$). Las reacciones autocatalíticas de los estados P_4 , P_5 y P_6 , y P_7 , P_8 y P_9 están representadas por una flecha moduladora circular discontinua (\dashrightarrow).

Las ecuaciones del *Modelo B* se presentan a continuación:

$$\frac{dP_1}{dt} = -k_{12}P_1Fe_{OUT}^{2+} - k_{14}P_1 + k_{41}P_4 - k_{17}P_1Ca_{OUT}^{2+} + k_{71}P_7 \quad (\text{Ecuación 4.19})$$

$$\frac{dP_2}{dt} = k_{12}P_1Fe_{OUT}^{2+} - k_{23}P_2 \quad (\text{Ecuación 4.20})$$

$$\frac{dP_3}{dt} = k_{23}P_2 - k_{34}P_3 \quad (\text{Ecuación 4.21})$$

$$\frac{dP_4}{dt} = k_{34}P_3 + k_{14}P_1 - k_{41}P_4 + k_{64}P_6P_4 - (k_{45}Fe_{OUT}^{2+}Ca_{OUT}^{2+})P_4P_5 \quad (\text{Ecuación 4.22})$$

$$\frac{dP_5}{dt} = (k_{45}Fe_{OUT}^{2+}Ca_{OUT}^{2+})P_4P_5 - k_{56}P_5P_6 \quad (\text{Ecuación 4.23})$$

$$\frac{dP_6}{dt} = k_{56}P_5P_6 - k_{64}P_6P_4 \quad (\text{Ecuación 4.24})$$

$$\frac{dP_7}{dt} = k_{17}P_1Ca_{OUT}^{2+} - k_{71}P_7 - (k_{78}Ca_{OUT}^{2+})P_7P_8 + k_{97}P_9P_7 \quad (\text{Ecuación 4.25})$$

$$\frac{dP_8}{dt} = (k_{78}Ca_{OUT}^{2+})P_7P_8 - k_{89}P_8P_9 \quad (\text{Ecuación 4.26})$$

$$\frac{dP_9}{dt} = k_{89}P_8P_9 - k_{97}P_9P_7 \quad (\text{Ecuación 4.27})$$

$$\frac{dFe_{IN}^{2+}}{dt} = k_{34}DMT1_E P_3 + \gamma k_{64}DMT1_E P_6 \quad (\text{Ecuación 4.28})$$

$$\frac{dFe_{OUT}^{2+}}{dt} = -\frac{V_{cb}}{V_a} \cdot \frac{dFe_{IN}^{2+}}{dt} \quad (\text{Ecuación 4.29})$$

$$\frac{dCa_{OUT}^{2+}}{dt} = k_{inca} \cdot Ca_{OUT}^{2+} - k_{outca} \cdot Ca_{OUT}^{2+} \quad (\text{Ecuación 4.30})$$

Las ecuaciones 4.19 a 4.24 y 4.28 a 4.30 son las mismas ecuaciones utilizadas en el *Modelo A*. En las ecuaciones 4.25 y 4.26, el término $(k_{78}Ca_{OUT}^{2+})$ explica la endocitosis de DMT1 que ocurre sólo por la presencia de Ca^{2+} en el medio apical. Como en el caso del oscilador de Ball, el retorno de DMT1 a la membrana apical cuando este transportador está endocitado y unido a Ca^{2+} solo puede ocurrir si los estados P_8 y P_9 son distintos de cero. Las condiciones iniciales de este modelo se establecieron como $Fe_{IN}^{2+}=0 \mu M$, $Fe_{OUT}^{2+}(0)=0$ o $10 \mu M$, $Ca_{OUT}^{2+}(0)=10 \mu M$, $1,5 mM$ o $3 mM$, $P_1(0)=0,20$, $P_2(0)=P_3(0)=P_4(0)=0$, $P_5(0)=0,18$, $P_6(0)=0,17$, $P_7(0)=0,10$, $P_8(0)=0,18$, $P_9(0)=0,17$.

Los parámetros del *Modelo B* se ajustaron utilizando el mismo conjunto de entrenamiento empleado con el *Modelo A*. El *Modelo B* tampoco logró capturar la dinámica de la variación de la concentración de DMT1 en la membrana apical para cada condición experimental estudiada a través de un único conjunto de parámetros. Después de ajustar los parámetros del *Modelo B* de manera global mediante la técnica de Jackknife, se encontró que los valores obtenidos para cada parámetro son cercanos, excepto los valores de k_{45} , k_{56} , k_{64} , k_{17} , k_{78} y k_{97} , que varían significativamente para cada condición experimental. Así, se ajustaron estos parámetros para cada condición experimental de forma independiente, manteniendo los valores encontrados en el primer ajuste para el resto de parámetros. Los valores de los parámetros así obtenidos se presentan en la sección A.5.2 de Anexos.

Las simulaciones del *Modelo B* para el comportamiento de DMT1 en la membrana apical a lo largo del tiempo, ante las diferentes condiciones experimentales estudiadas en las células Caco-2, se realizaron utilizando los parámetros obtenidos de dicho ajuste y se muestran en la [Figura 4.4](#), en la cual se comparan el promedio de los datos experimentales de cada caso con su respectiva simulación.

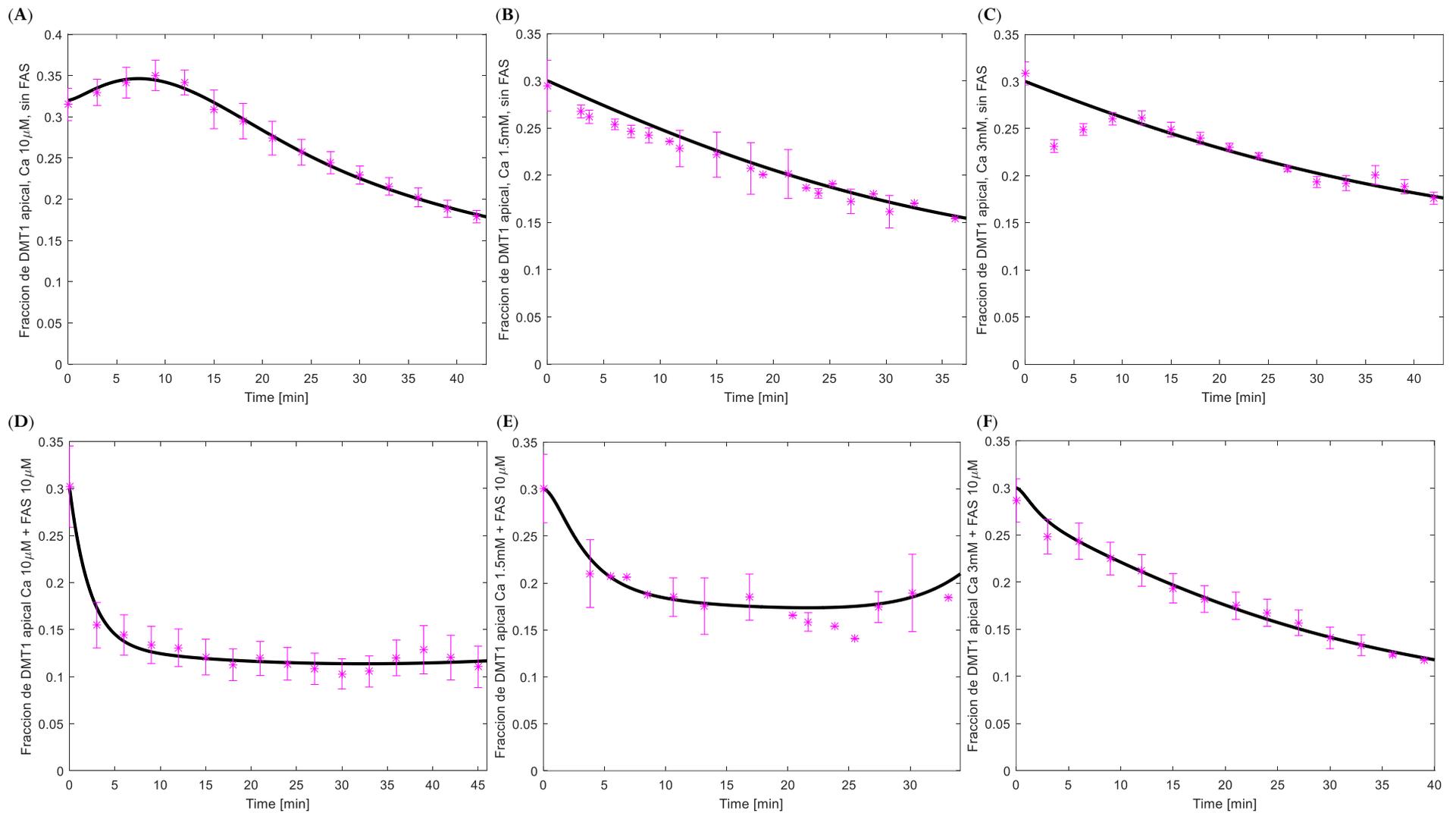


Figura 4.4. Simulación del Modelo B. Simulación del modelo (curvas negras) y datos experimentales (* rosados) de la fracción de DMT1 en la membrana apical ($P_1 + P_2 + P_3 + P_4 + P_7$) después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por: **(A)** $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $0\ \mu\text{M}$ de FAS, **(B)** $1,5\ \text{mM}$ de CaCl_2 y $0\ \mu\text{M}$ de FAS, **(C)** $3\ \text{mM}$ de CaCl_2 y $0\ \mu\text{M}$ de FAS, **(D)** $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $10\ \mu\text{M}$ de FAS, **(E)** $1,5\ \text{mM}$ de CaCl_2 y $10\ \mu\text{M}$ de FAS, **(F)** $3\ \text{mM}$ de CaCl_2 y $10\ \mu\text{M}$ de FAS. Los asteriscos corresponden al valor promedio de las muestras del conjunto de entrenamiento y las barras de error indican su desviación estándar.

Los resultados de la simulación en la [Figura 4.4](#) muestran la capacidad del *Modelo B* para representar la relocalización de DMT1 observada experimentalmente para el conjunto de entrenamiento en todos los escenarios analizados en las células Caco-2, es decir, cuando estas se desafían o no con 10 μM de FAS en el medio apical en presencia de cualquiera de las tres concentraciones de Ca^{2+} utilizadas.

Los coeficientes de determinación obtenidos fueron: $R^2 = 0,9934$ para 0 μM de FAS y 10 μM de $CaCl_2$, $R^2 = 0,9315$ para 0 μM de FAS y 1,5 mM de $CaCl_2$, $R^2 = 0,7483$ para 0 μM de FAS y 3 mM de $CaCl_2$, $R^2 = 0,9677$ para 10 μM de FAS y 10 μM de $CaCl_2$, $R^2 = 0,8595$ para 10 μM de FAS y 1,5 mM de $CaCl_2$, $R^2 = 0,9731$ para 10 μM de FAS y 3 mM de $CaCl_2$.

En la [Figura 4.4C](#), que representa los datos obtenidos cuando las concentraciones de hierro y calcio en el medio apical de los insertos era de 0 μM de FAS y 3 mM de $CaCl_2$, puede apreciarse que, para los datos obtenidos a los 3 y 6 minutos, el modelo sobrestima la concentración de DMT1 en la membrana apical, y por ello, para este caso, se obtuvo el coeficiente de determinación más bajo ($R^2 = 0,7483$). Esto indica que el modelo no es capaz de representar la rápida endocitosis que sufre DMT1 en los primeros 3 minutos luego de exponerse a 3 mM de $CaCl_2$.

Por otro lado, para el ajuste de parámetros obtenido (ver sección A.5.2 de Anexos), cuando en el medio apical de los insertos habían 10 μM de FAS y 10 μM de $CaCl_2$, se obtuvo que el parámetro k_{64} es negativo, y cuando habían 3 mM de $CaCl_2$ y 0 o 10 μM de FAS, se obtuvo que el parámetro k_{97} es negativo, lo cual no tiene sentido biológico. Destaca que en ambos casos los parámetros negativos están asociados a la reacción en alguno de los osciladores de Ball que permite el retorno de DMT1 endocitado a la membrana apical, por lo que, al hacer estos parámetros negativos, el modelo busca mantener endocitado el transportador.

Considerando que el *Modelo B* planteado en general es capaz de representar la relocalización de DMT1 en la membrana apical de acuerdo con los datos experimentales, pero que parámetros asociados al retorno de DMT1 a la membrana apical son negativos para tres de los seis casos analizados, a continuación, se plantea un nuevo modelo que buscará mantener la capacidad de predicción de *Modelo B*, pero con parámetros que tengan sentido biológico para representar los cambios en los estados de DMT1.

4.3.3 Modelo C

Recordando el modelo planteado en el Capítulo 2, presentado en la [Figura 2.4](#), se tenían cuatro posibles estados para DMT1, que eran: DMT1 vacío, DMT1 unida a Fe_{OUT}^{2+} , DMT1 unida a Ca_{OUT}^{2+} , y DMT1 unida a Fe_{OUT}^{2+} y a Ca_{OUT}^{2+} , siendo este último estado catalíticamente inactivo. Considerando esto y que los parámetros negativos encontrados para el *Modelo B* están relacionados con el retorno de DMT1 a la membrana apical, para el *Modelo C* propuesto en esta sección, se incorporó un nuevo estado de DMT1 en la membrana apical, que represente la fracción de este transportador unida tanto a hierro como a calcio, como se muestra en la [Figura 4.5](#).

Las ecuaciones del *Modelo C* se presentan a continuación:

$$\frac{dP_1}{dt} = -k_{12}P_1Fe_{OUT}^{2+} - k_{14}P_1 + k_{41}P_4 - k_{17}P_1Ca_{OUT}^{2+} + k_{71}P_7 \quad (\text{Ecuación 4.31})$$

$$\frac{dP_2}{dt} = k_{12}P_1Fe_{OUT}^{2+} - k_{23}P_2 + k_{102}P_{10} - k_{210}P_2Ca_{OUT}^{2+} \quad (\text{Ecuación 4.32})$$

$$\frac{dP_3}{dt} = k_{23}P_2 - k_{34}P_3 \quad (\text{Ecuación 4.33})$$

$$\frac{dP_4}{dt} = k_{34}P_3 + k_{14}P_1 - k_{41}P_4 + k_{64}P_6P_4 - (k_{45}Fe_{OUT}^{2+}Ca_{OUT}^{2+})P_4P_5 \quad (\text{Ecuación 4.34})$$

$$\frac{dP_5}{dt} = (k_{45}Fe_{OUT}^{2+}Ca_{OUT}^{2+})P_4P_5 - k_{56}P_5P_6 \quad (\text{Ecuación 4.35})$$

$$\frac{dP_6}{dt} = k_{56}P_5P_6 - k_{64}P_6P_4 \quad (\text{Ecuación 4.36})$$

$$\frac{dP_7}{dt} = k_{17}P_1Ca_{OUT}^{2+} - k_{71}P_7 - (k_{78}Ca_{OUT}^{2+})P_7P_8 + k_{97}P_9P_7 - k_{710}P_7Fe_{OUT}^{2+} \quad (\text{Ecuación 4.37})$$

$$\frac{dP_8}{dt} = (k_{78}Ca_{OUT}^{2+})P_7P_8 - k_{89}P_8P_9 \quad (\text{Ecuación 4.38})$$

$$\frac{dP_9}{dt} = k_{89}P_8P_9 - k_{97}P_9P_7 \quad (\text{Ecuación 4.39})$$

$$\frac{dP_{10}}{dt} = k_{710}P_7Fe_{OUT}^{2+} - k_{102}P_{10} + k_{210}P_2Ca_{OUT}^{2+} \quad (\text{Ecuación 4.40})$$

$$\frac{dFe_{IN}^{2+}}{dt} = k_{34}DMT1_E P_3 + \gamma k_{64}DMT1_E P_6 \quad (\text{Ecuación 4.41})$$

$$\frac{dFe_{OUT}^{2+}}{dt} = -\frac{V_{cb}}{V_a} \cdot \frac{dFe_{IN}^{2+}}{dt} \quad (\text{Ecuación 4.42})$$

$$\frac{dCa_{OUT}^{2+}}{dt} = k_{inca} \cdot Ca_{OUT}^{2+} - k_{outca} \cdot Ca_{OUT}^{2+} \quad (\text{Ecuación 4.43})$$

Las ecuaciones 4.31, 4.33–4.36, 4.38–4.39 y 4.41–4.43 son las mismas ecuaciones utilizadas en el *Modelo B*. Para la incorporación del nuevo estado P_{10} , sólo considero reversible la transición $P_2 \leftrightarrow P_{10}$, considerando que la concentración de hierro en el espacio intracelular cerca de la membrana apical es demasiado baja para permitir una interacción con DMT1 (Pujol-Giménez y col., 2017). El término $(k_{102}P_{10} - k_{210}P_2Ca_{OUT}^{2+})$ en la ecuación 4.32 y el término $(k_{710}P_7Fe_{OUT}^{2+})$ en la ecuación 4.37 provienen de la adición del estado P_{10} al *Modelo C*, en comparación con el *Modelo B*. Las condiciones iniciales del *Modelo C* se establecieron como $Fe_{IN}^{2+}=0 \mu M$, $Fe_{OUT}^{2+}(0)=0$ o $10 \mu M$, $Ca_{OUT}^{2+}(0)=10 \mu M$, $1,5 mM$ o $3 mM$, $P_1(0)=0,22$, $P_2(0)=P_3(0)=P_4(0)=0$, $P_5(0)=0,2$, $P_6(0)=0,10$, $P_7(0)=0,08$, $P_8(0)=0,25$, $P_9(0)=0,15$, $P_{10}(0)=0$. Los parámetros del *Modelo C* se ajustaron utilizando el conjunto de entrenamiento utilizado anteriormente. En este caso, un único conjunto de parámetros tampoco logró capturar la dinámica de la variación de la concentración de DMT1 en la membrana apical para cada condición experimental estudiada. Luego de ajustar los parámetros del *Modelo C* de manera global, se encontró que, al igual que con el *Modelo B*, los valores obtenidos para cada parámetro son cercanos, excepto los valores de k_{45} , k_{56} , k_{64} , k_{17} , k_{78} y k_{97} , que varían significativamente para cada condición experimental. Por ello, se ajustaron estos parámetros para cada condición experimental de forma independiente, manteniendo los valores encontrados en el primer ajuste para el resto de parámetros. Los valores de los parámetros así obtenidos se presentan en la sección A.5.3 de Anexos.

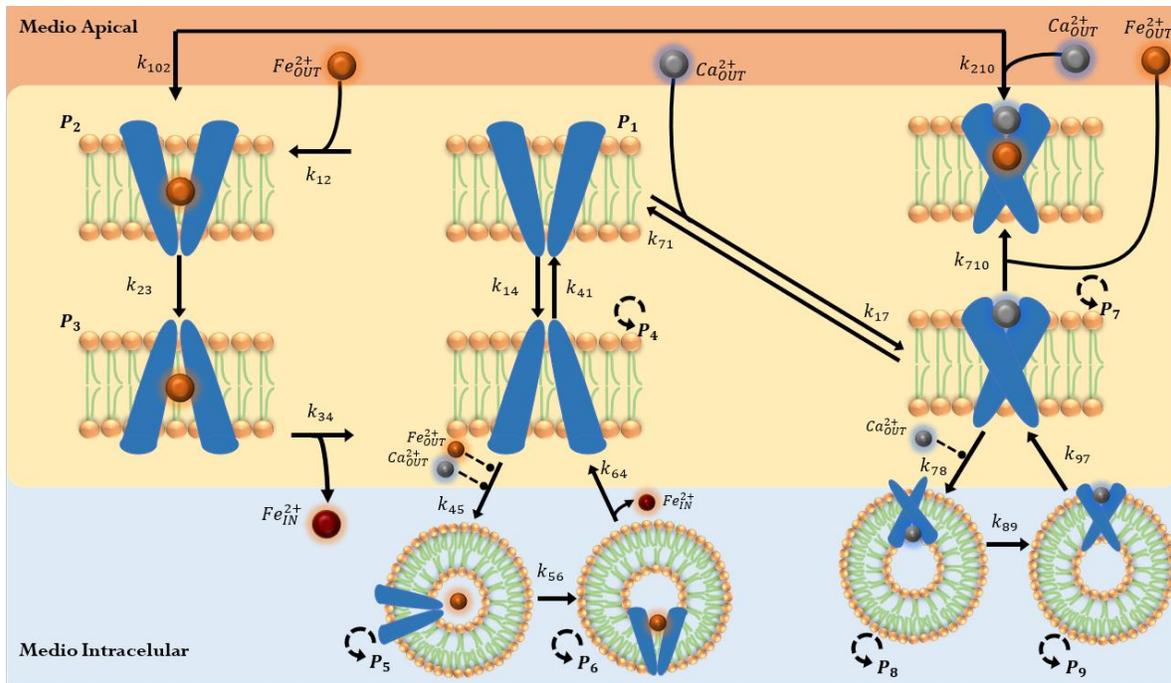


Figura 4.5. Modelo C. DMT1 en la membrana apical vacío y orientado hacia el lado apical (P_1), puede unirse al calcio del medio apical (P_7) y posteriormente al hierro de este medio (P_{10}), o unirse primero al hierro del medio apical (P_2) y posteriormente al hierro de este medio (P_{10}), donde DMT1 unido a calcio, teniendo o no unido hierro, no podrá transportar hierro. Círculo naranja: concentración de hierro extracelular (Fe_{OUT}^{2+}); círculo marrón: concentración de hierro en el espacio intracelular-basolateral (Fe_{IN}^{2+}); círculo gris: concentración de calcio extracelular (Ca_{OUT}^{2+}). El hierro y el calcio extracelular se consideran factores reguladores de las endocitosis, representados como una flecha moduladora discontinua ($--\bullet$). Las reacciones autocatalíticas de los estados P_4 , P_5 y P_6 , y P_7 , P_8 y P_9 están representadas por una flecha moduladora circular discontinua (\curvearrowright).

Utilizando los parámetros obtenidos del ajuste descrito previamente, se realizaron las simulaciones del *Modelo C* para representar, ante las diferentes condiciones experimentales analizadas, el comportamiento de DMT1 en la membrana apical a lo largo del tiempo. Estas simulaciones se presentan en la [Figura 4.6](#) para el conjunto de entrenamiento y en la [Figura 4.7](#) para el conjunto de validación, en las cuales se comparan el promedio de los datos experimentales de cada caso con su respectiva simulación. Los resultados de la simulación muestran que el modelo es capaz de representar la dinámica de la concentración de DMT1 en la membrana apical, tanto cualitativa como cuantitativamente. Por lo tanto, el *Modelo C* captura las diferentes dinámicas de endocitosis y exocitosis de DMT1 según las concentraciones de calcio y/o hierro presentes en el medio apical de los insertos.

Todos los parámetros obtenidos en el ajuste son positivos y se identifican como significativos a niveles de confianza del 95 %, ya que todos los *p-value* son inferiores a 0,05 (*t-test*). El coeficiente de determinación (R^2) calculado entre la simulación del *Modelo C* y los datos experimentales de la concentración de DMT1 en la membrana apical para cada caso investigado, tanto para el conjunto de entrenamiento como para el de validación, se presentan junto con los valores del conjunto de parámetros en la sección A.5.3 de Anexos. Los altos valores del coeficiente de determinación obtenidos en cada caso indican que el *Modelo C* propuesto explican un alto porcentaje de la varianza experimental de los datos considerados.

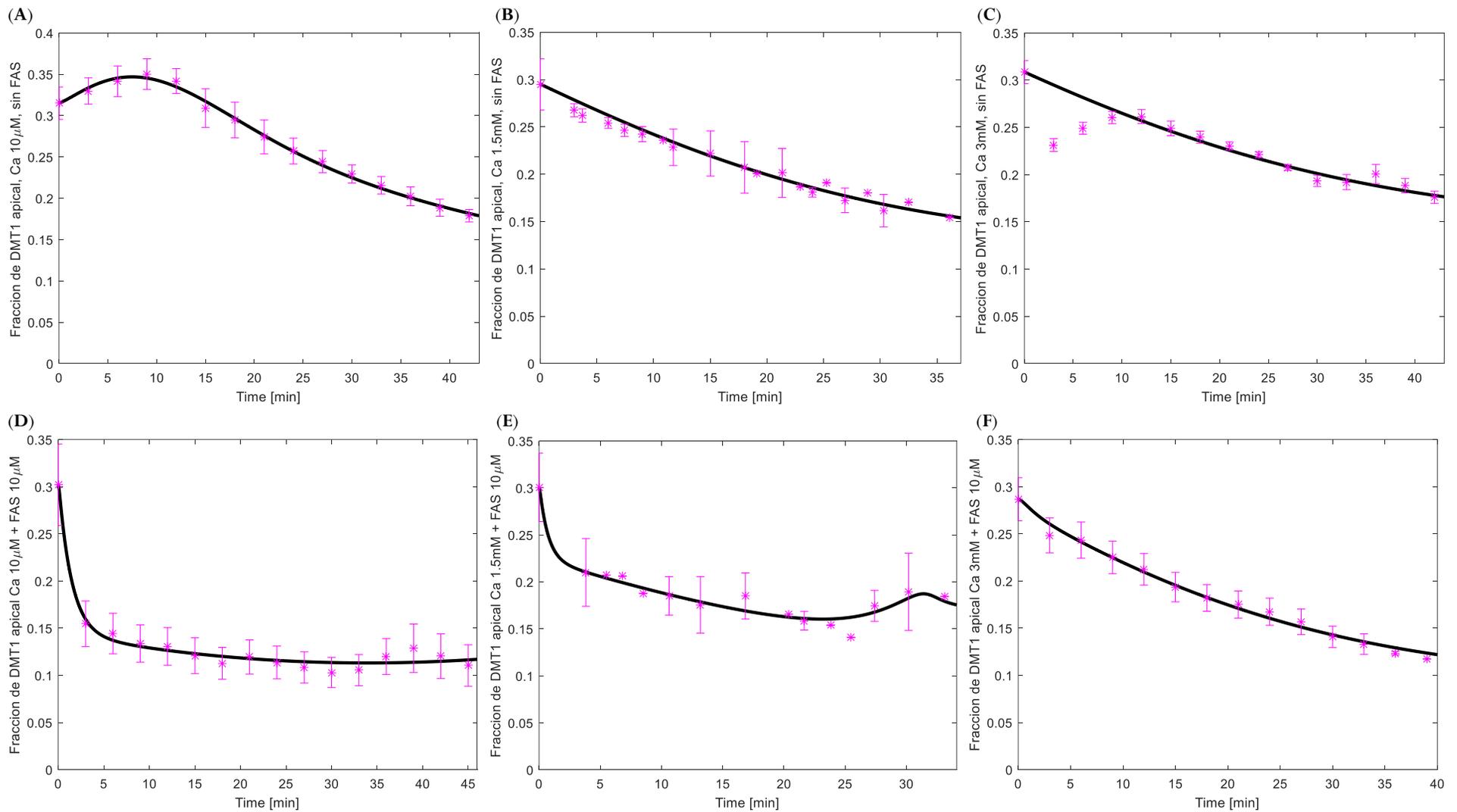


Figura 4.6. Simulación del Modelo C para el conjunto de entrenamiento. Simulación del modelo (curvas negras) y datos experimentales del conjunto de entrenamiento (* rosados) de la fracción de DMT1 en la membrana apical después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por: **(A)** 10 μM de CaCl_2 y 0 μM de FAS, **(B)** 1,5 mM de CaCl_2 y 0 μM de FAS, **(C)** 3 mM de CaCl_2 y 0 μM de FAS, **(D)** 10 μM de CaCl_2 y 10 μM de FAS, **(E)** 1,5 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS, **(F)** 3 mM de CaCl_2 y 10 μM de FAS. Los asteriscos corresponden al valor promedio de las muestras del conjunto de entrenamiento y las barras de error indican su desviación estándar.

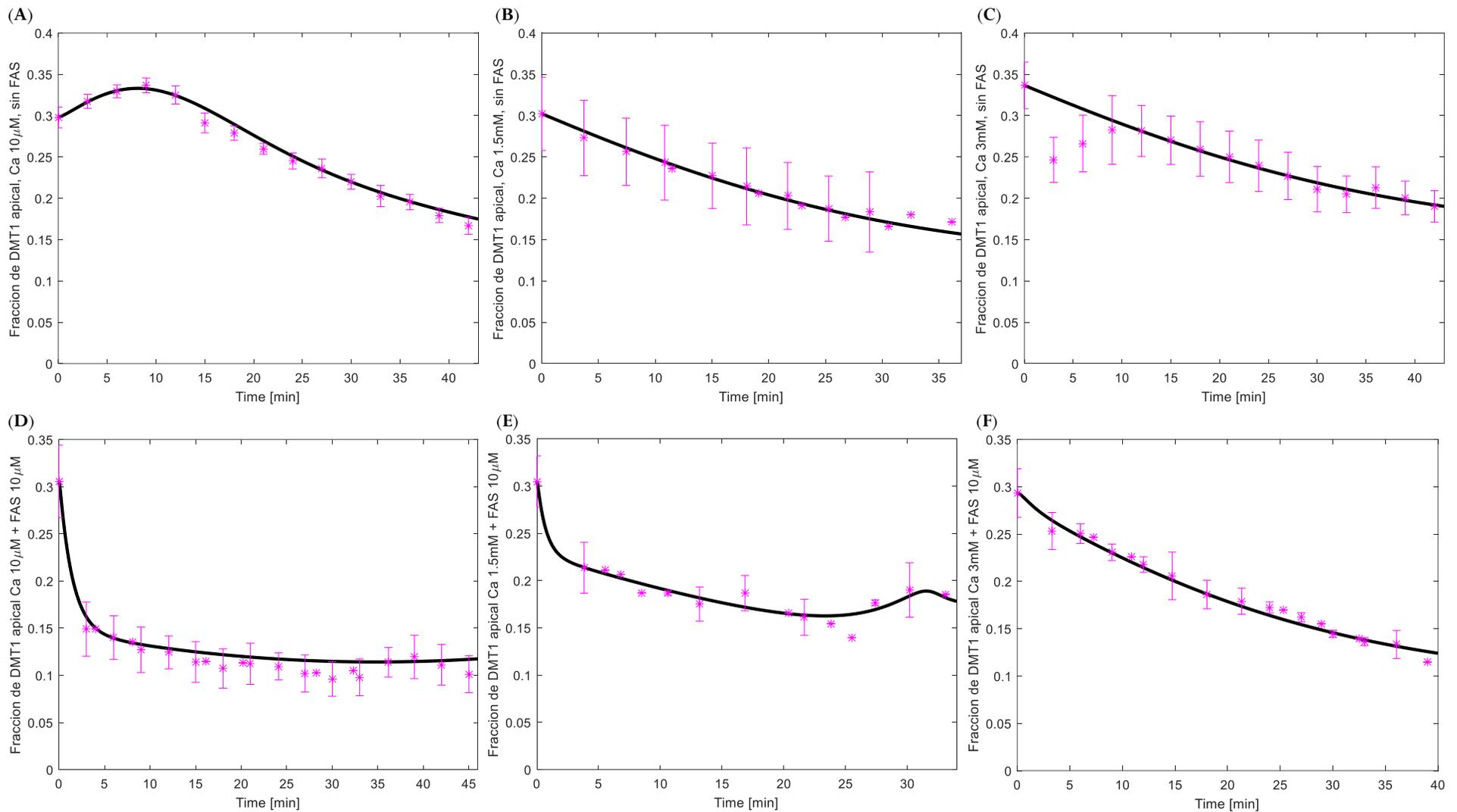


Figura 4.7. Simulación del Modelo C para el conjunto de validación. Simulación del modelo (curvas negras) y datos experimentales del conjunto de validación (* rosados) de la fracción de DMT1 en la membrana apical después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por: (A) $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $0\ \mu\text{M}$ de FAS, (B) $1,5\ \text{mM}$ de CaCl_2 y $0\ \mu\text{M}$ de FAS, (C) $3\ \text{mM}$ de CaCl_2 y $0\ \mu\text{M}$ de FAS, (D) $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $10\ \mu\text{M}$ de FAS, (E) $1,5\ \text{mM}$ de CaCl_2 y $10\ \mu\text{M}$ de FAS, (F) $3\ \text{mM}$ de CaCl_2 y $10\ \mu\text{M}$ de FAS. Los asteriscos corresponden al valor promedio de las muestras del conjunto de entrenamiento y las barras de error indican su desviación estándar.

El comportamiento previsto por el *Modelo C* para la concentración de calcio extracelular en cada caso estudiado, utilizando el conjunto de entrenamiento, se muestra la [Figura 4.8](#). Para el conjunto de validación los resultados obtenidos son muy similares por lo que no se muestran. Las simulaciones del modelo predicen que durante los primeros 30 minutos de experimentación, esta concentración disminuye cerca de $0,025 \mu M$ cuando la concentración de calcio era de $10 \mu M$, cerca de $3 \mu M$ cuando la concentración de calcio era de $1,5 mM$ y cerca de $8 \mu M$ cuando la concentración de calcio era de $3 mM$. Esta disminución de la concentración de calcio en el medio apical se debería a procesos que no son considerados dentro del modelo, ya que DMT1 no transporta Ca^{2+} .

Por otro lado, tal como se esperaba, el modelo predice exitosamente que luego de desafiar las células Caco-2 con hierro en el compartimiento apical de los insertos, la captación de hierro es menor mientras mayor sea la concentración de calcio en este medio, tal como se muestra en las [Figuras 4.9 C, D y E](#), por lo que el modelo también señala que el calcio inhibe la captación de hierro en las células Caco-2 de una manera dependiente de la concentración. Observando los primeros minutos de la simulación, se aprecia que para la [Figuras 4.9 C](#), la pendiente inicial es mayor que para los casos de las [Figuras 4.9 D y E](#), lo cual implica que el modelo predice una mayor captación de hierro desde el primer instante de exposición de las células a $10 \mu M$ de FAS cuando el medio apical se tiene una concentración de calcio de $10 \mu M$ de $CaCl_2$. Aunque no se contaba con datos experimentales sobre la concentración de hierro que lograban captar las células bajo las condiciones experimentales analizadas en este trabajo, se obtuvieron valores cercanos a los datos experimentales obtenidos por [Colins y col. \(2017\)](#), para la captación apical de hierro después de un desafío de $5 \mu M$, $10 \mu M$ o $20 \mu M$ de hierro en el medio apical de las células Caco-2, como se mostró en la [Figura 1.12](#). Esto indica que el *Modelo C* logró predecir valores para la captación de hierro por parte de las células Caco-2 que se encuentran en el rango de valores experimentales reportados previamente, por lo que los resultados obtenidos pueden ser interpretados en el contexto experimental.

En las [Figuras 4.9 A, B y C](#) se puede apreciar que el *Modelo C* predice una pequeña captación de hierro, aunque para estos casos en el medio apical la concentración de hierro es de $0 \mu M$ de FAS; esto se debe a que, para que los osciladores de Ball acoplados al modelo funcionen, las fracciones P_5 y P_6 de DMT1 no pueden ser cero y, por lo tanto, el modelo predice una pequeña liberación de hierro al citosol que se deben a la transición $P_6 \rightarrow P_4$. Los resultados mostrados para la se obtuvieron utilizando los datos experimentales del conjunto de entrenamiento, ya que para el conjunto de validación los resultados obtenidos son muy similares y por ello no se muestran.

En las [Figuras 4.6C y 4.7C](#), que representan los datos obtenidos para los conjuntos de entrenamiento y validación, cuando las concentraciones de hierro y calcio en el medio apical de los insertos era de $0 \mu M$ de FAS y $3 mM$ de $CaCl_2$, entre los minutos 3 y 6 de las simulaciones, el *Modelo C* también sobrestima la concentración de DMT1 en la membrana apical, razón por la cual en este caso se obtuvo el menor coeficiente de determinación de todos ($R^2 = 0,7393$ y $R^2 = 0,7151$ para los conjuntos de entrenamiento y validación, respectivamente). Por lo tanto, el *Modelo C* tampoco es capaz de representar la rápida endocitosis de DMT1 que ocurre en los primeros 3 minutos luego de exponer las células a $3 mM$ de $CaCl_2$ en el medio apical.

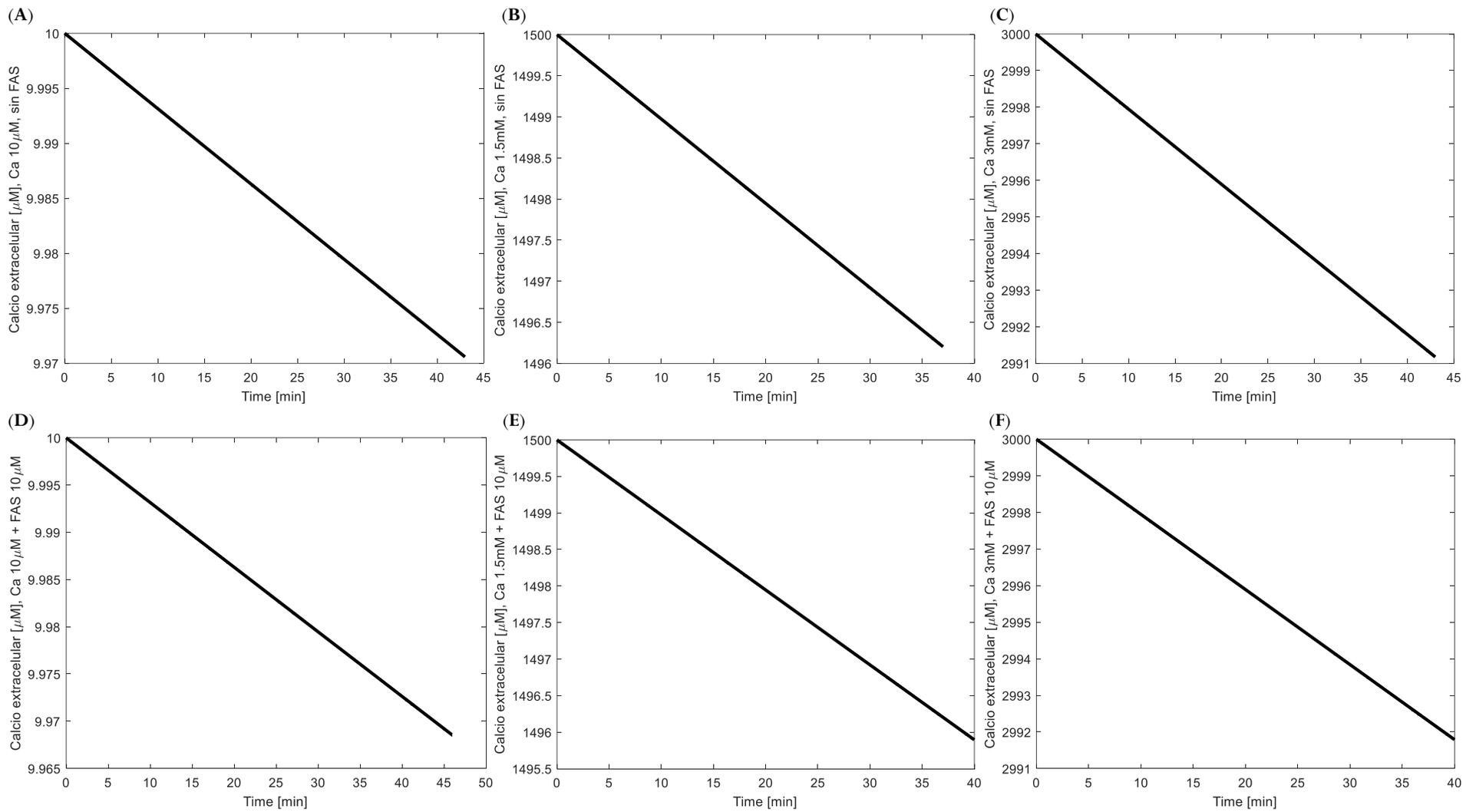


Figura 4.8. Simulación de la variación de calcio extracelular en el medio apical predicha por el *Modelo C* para el conjunto de validación. Simulación del modelo (curvas negras) para variación de la concentración de Ca^{2+} en el compartimento apical de las células Caco-2, después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por: (A) $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $0 \mu\text{M}$ de FAS, (B) $1,5 \text{ mM}$ de CaCl_2 y $0 \mu\text{M}$ de FAS, (C) 3 mM de CaCl_2 y $0 \mu\text{M}$ de FAS, (D) $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS, (E) $1,5 \text{ mM}$ de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS, (F) 3 mM de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS.

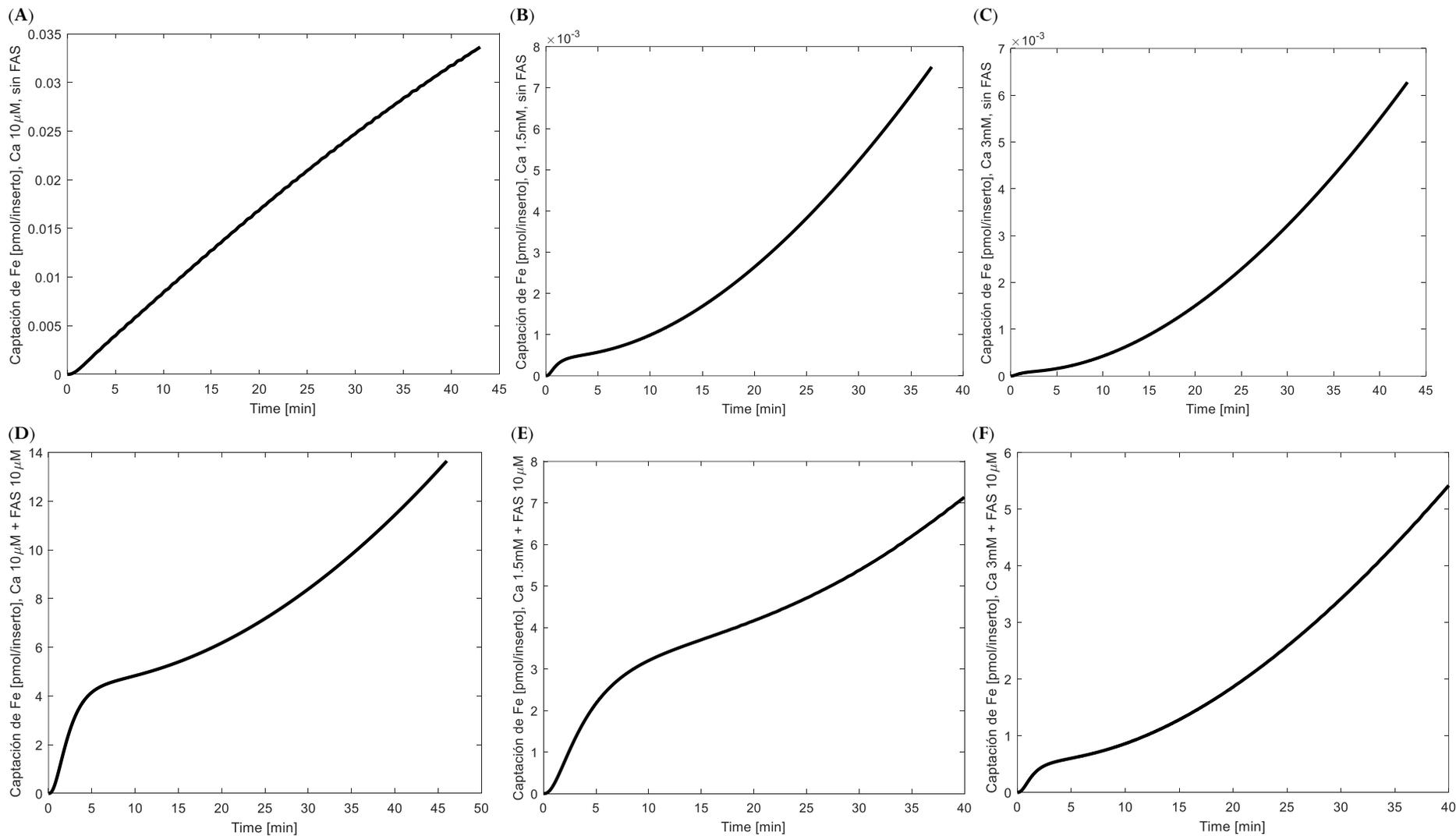


Figura 4.9. Simulación de la captación de hierro predicha por el *Modelo C* para el conjunto de validación. Simulación del modelo (curvas negras) para la captación de Fe^{2+} de las células Caco-2, después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por: (A) $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $0 \mu\text{M}$ de FAS, (B) 1.5 mM de CaCl_2 y $0 \mu\text{M}$ de FAS, (C) 3 mM de CaCl_2 y $0 \mu\text{M}$ de FAS, (D) $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS, (E) 1.5 mM de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS, (F) 3 mM de CaCl_2 y $10 \mu\text{M}$ de FAS.

Esto lleva a pensar que, cuando se utilizaron $0 \mu\text{M}$ de FAS y 3mM de CaCl_2 en el medio apical de las células Caco-2, posiblemente durante los 3 primeros minutos luego de aumentar la concentración de calcio, sólo ocurre el proceso de endocitosis de DMT1 desde la membrana apical. En el modelo por otro lado, la endocitosis y la exocitosis de DMT1 ocurren de manera simultánea. En base a esto se propuso una modificación en el *Modelo C* sólo para este caso, obligando a que el retorno de DMT1 a la membrana apical no ocurra durante los primeros 3 minutos de la simulación, lo cual se logra forzando a las constantes de velocidad de las transiciones $P_6 \rightarrow P_4$ y $P_9 \rightarrow P_7$ a que sean iguales a cero durante los primeros 3 minutos de simulación ($k_{64} = 0$ y $k_{97} = 0$ mientras $0 < t \leq 3$ minutos), y forzando a las constantes de velocidad de las transiciones $P_4 \rightarrow P_5$ y $P_7 \rightarrow P_8$ a que sean iguales a cero desde el minuto 3 hasta los 11 minutos de la simulación ($k_{45} = 0$ y $k_{78} = 0$ mientras $3 < t \leq 11$ minutos).

Se realizó un ajuste de parámetros para las ecuaciones diferenciales 4.31–4.43, agregando las restricciones mencionadas anteriormente para los parámetros k_{64} , k_{97} , k_{45} y k_{78} , utilizando el conjunto de entrenamiento. Los parámetros obtenidos para el caso analizado, cuando en el medio apical se tienen $0 \mu\text{M}$ de FAS y 3mM de CaCl_2 se presentan en la sección A.5.4 de Anexos. Con estos parámetros, se realizaron las simulaciones del *Modelo C* para representar el comportamiento de DMT1 en la membrana apical a lo largo del tiempo. Estas simulaciones se presentan en la [Figura 4.10A](#) para el conjunto de entrenamiento y en la [Figura 4.10B](#) para el conjunto de validación.

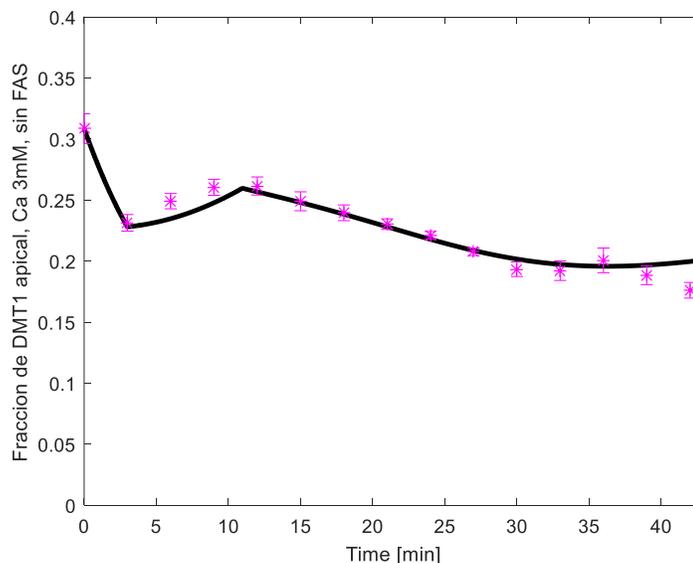
Los resultados de la simulación ([Figura 4.10](#)) muestran que la incorporación de las restricciones en los procesos de endocitosis y retorno a la membrana de DMT1 hacen que la predicción del modelo tenga un comportamiento más cercano al de los datos experimentales obtenidos, lo cual se evidencia también al comparar los coeficientes de determinación, ya que cuando se incorporan las restricciones, se obtiene: un $R^2 = 0,9523$ para el conjunto de entrenamiento que es mayor al obtenido para el *Modelo C* sin modificar ($R^2 = 0,7393$), y un $R^2 = 0,8160$ para el conjunto de validación que también es mayor al obtenido para el *modelo C* sin modificar ($R^2 = 0,7151$).

Por lo tanto, cuando las células Caco-2 se exponen a altas concentraciones de calcio sin hierro, DMT1 se endocita rápidamente, pero luego, aunque la concentración de calcio no se modifica, ocurre un pequeño retorno de DMT1 a la membrana apical para luego continuar endocitándose. La naturaleza de este fenómeno hasta ahora es desconocida, pero se puede decir, tanto por la evidencia experimental como por lo predicho por el *Modelo C* modificado para este caso, que durante los primeros tres minutos el retorno de DMT1 a la membrana apical se vería abolido totalmente por la presencia de 3mM de CaCl_2 en la membrana apical, y que durante los siguientes seis minutos sólo ocurriría un lento retorno de DMT1 a la membrana apical, para luego sí darse tanto el retorno de DMT1 a la membrana apical como la endocitosis de manera simultánea.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las restricciones incorporadas al modelo sólo se pueden emplear para representar uno de los seis casos analizados, es decir, aunque el *Modelo C* con restricciones permite representar de manera más precisa el comportamiento de DMT1 ante $0 \mu\text{M}$ de FAS y 3mM de CaCl_2 , este modelo no puede utilizarse para representar el comportamiento de DMT1 en la membrana apical en presencia de cualquier concentración de hierro o de calcio extracelular. Esto lleva a pensar que posiblemente los parámetros del *Modelo C* original no son constantes a lo largo del experimento, es decir, que los parámetros del modelo probablemente varían durante el tiempo debido al rol del calcio

en el ciclo endocítico del hierro y también a efectos no-lineales que pueden ser atribuidos a factores desconocidos o de difícil modelación no considerados en el diseño del modelo, tanto del proceso de transporte de hierro en sí como de procesos celulares en general.

(A)



(B)

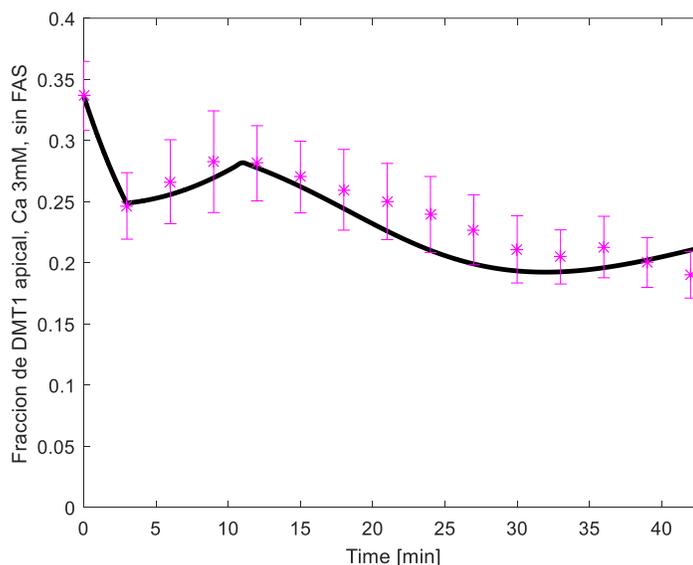


Figura 4.10. Simulación del Modelo C con restricciones. Simulación del modelo (curvas negras) y datos experimentales del conjunto de validación (* rosados) de la fracción de DMT1 en la membrana apical después de cambiar la concentración de calcio y/o hierro en el medio apical de las células Caco-2 por 3 mM de CaCl₂ y 0 μM de FAS, para: (A) el conjunto de entrenamiento, (B) el conjunto de validación. Los asteriscos corresponden al valor promedio de las muestras del conjunto de entrenamiento y las barras de error indican su desviación estándar.

4.4 Conclusiones

El objetivo principal del presente capítulo fue plantear y validar un modelo matemático que permitiera describir el movimiento de DMT1-1A/IRE(+) en las células

Caco-2 asociado al proceso de captación de hierro no hemo, en presencia y ausencia de calcio extracelular.

El proceso de transporte de hierro a través del enterocito requiere el funcionamiento coordinado de una serie de mecanismos biológicos que interactúan de una manera altamente compleja que, hasta la fecha, no se comprenden completamente. El uso de modelos matemáticos que recuperen el comportamiento experimental observado permite establecer un marco analítico para la descripción y análisis de los elementos clave de estos mecanismos y sus interacciones, lo cual finalmente puede contribuir a profundizar la comprensión de cómo se desencadenan las enfermedades y los trastornos asociados con el sistema de absorción de hierro. Hasta ahora, existen diversos modelos matemáticos del metabolismo sistémico del hierro; sin embargo, ninguno considera de manera explícita el movimiento de DMT1 ni el efecto inhibitorio del calcio durante la absorción de hierro.

El modelo fenomenológico desarrollado por [Cegarra y col. \(2019\)](#), se utilizó como modelo punto de partida para el desarrollo de los modelos matemáticos presentados en este trabajo, ya que fue el primer modelo fenomenológico reportado que brinda una descripción de los estados DMT1 y su internalización, para representar la complejidad del proceso de absorción de hierro, y puede predecir el comportamiento de los flujos de absorción de hierro observados experimentalmente luego de desafiar a las células Caco-2 con una dosis inicial de hierro, y la reducción en la absorción de hierro observada como resultado del bloqueo de la mucosa después de una segunda dosis de hierro.

En este capítulo se presentaron tres modelos fenomenológicos desarrollados para describir el movimiento de DMT1-1A/IRE(+) en las células Caco-2 asociado a los cambios en la concentración de calcio extracelular en el medio apical y al proceso de captación de hierro no hemo, los cuales se generaron a partir de la información reportada en literatura y de la evidencia experimental obtenida en este trabajo. Los modelos fenomenológicos generados, tienen en cuenta sólo los principales componentes biológicos del sistema ya que, considerando la complejidad de este proceso, se necesitó proponer supuestos que se basan en las observaciones experimentales desarrolladas hasta ahora para simplificar el planteamiento del modelo, pues la complejidad del fenómeno no hace viable la inclusión de todos los factores que intervienen en el proceso. Específicamente, los modelos consideran una descripción de los estados de DMT1 en la membrana apical y su endocitosis para representar la dinámica de relocalización de DMT1 en la membrana apical observada experimentalmente en las células Caco-2.

Las ecuaciones diferenciales para todas las especies de cada modelo planteado se presentaron en este capítulo. Los parámetros obtenidos para cada modelo se encuentran en la sección A.5 de Anexos, y se ajustaron utilizando el conjunto de entrenamiento y minimizando el error de generalización dado por el error cuadrático medio de Jackknife (MSE_{jk}). El conjunto de entrenamiento está conformado por los datos experimentales obtenidos para la relocalización de DMT1 en: (i) 4 células cuando sólo se varía la concentración de calcio extracelular sin agregar FAS, (ii) 3 células cuando el desafío de hierro en el compartimento apical se realiza en presencia de diferentes concentraciones de calcio. Los datos experimentales de la relocalización de DMT1 obtenidos para 3 células en todos los casos se utilizaron para validar el modelo.

Para describir el comportamiento oscilatorio del transportador de hierro, se planteó un primer modelo llamado *Modelo A*, el cual acopla el oscilador de Ball para representar a las vesículas que tienen en sus membranas al transportador DMT1 en un estado capaz de transportar Fe^{2+} . Por otro lado, para representar la internalización de DMT1 inducida por la

concentración de calcio extracelular, se considera que cuando Ca^{2+} extracelular se une a DMT1, este transportador también puede endocitarse en vesículas pero en este caso no podrá transportar hierro. Las simulaciones del *Modelo A* muestran que tiene la capacidad de representar la relocalización de DMT1 cuando las células Caco-2 se desafían con $10 \mu\text{M}$ de FAS, pero no logra representar adecuadamente los datos experimentales de la dinámica de DMT1 en la membrana apical cuando únicamente varía la concentración de Ca^{2+} extracelular, sin la adición de FAS. Además, el valor parámetro k_{71} obtenido del ajuste de parámetros es negativo, lo cual no tiene sentido biológico

La limitada capacidad del *Modelo A* se debe a que no puede representar oscilaciones en los estados P_7 y P_8 . Por ello, se propuso el *Modelo B*, el cual acopla otro oscilador de Ball a través del estado P_7 (DMT1 unido a Ca^{2+} en la membrana apical). Los resultados de la simulación de este modelo para todos los casos analizados muestran su capacidad para representar la relocalización de DMT1 observada experimentalmente. Para describir el comportamiento oscilatorio de DMT1, se consideró que los procesos de endocitosis y retorno a la membrana apical de DMT1 dependen de si el transportador está o no unido a calcio, razón por la cual se incluyeron dos osciladores de Ball. De esta manera, se tiene en cuenta el efecto inhibitor del calcio en la captación de hierro que Ca^{2+} ejerce sobre DMT1, ya que se puede alterar no solo la ubicación de este transportador en la membrana apical según la concentración de calcio extracelular, sino también su capacidad de transporte de hierro, tal como se evidencio experimentalmente, ya que, en el modelo, cuando DMT1 está en vesículas pero unido a Ca^{2+} no puede transportar hierro al citosol.

Si bien el *Modelo B* fue capaz de estimar la fracción de DMT1 ubicada en la membrana apical, los valores de varios parámetros del *Modelo B* obtenidos del ajuste y asociados a las reacciones en los osciladores de Ball, son negativos. Por esta razón, se planteó un nuevo modelo, llamado *Modelo C*, en el cual, teniendo en cuenta todo lo considerado en los modelos anteriores, se incorporará además un nuevo estado de DMT1 en la membrana apical, que represente la fracción de este transportador unida tanto a hierro como a calcio.

Los parámetros del *Modelo C* se identificaron como significativos a niveles de confianza del 95% (prueba t). El alto valor obtenido del coeficiente de determinación para cada caso estudiado indica que el *Modelo C* propuesto explica un alto porcentaje de la varianza experimental de los datos experimentales considerados. El *Modelo C* planteado reprodujo cualitativa y cuantitativamente las principales características de la variación de la concentración de DMT1 en la membrana apical observada experimentalmente luego de modificar la concentración de calcio en el compartimiento apical de los insertos de las células Caco-2, con o sin la presencia de $10 \mu\text{M}$ de FAS, y además permite suministrar una interpretación biológica de los principales mecanismos implicados en el proceso de captación de hierro no hemo en presencia de diferentes concentraciones de calcio extracelular. Esto respalda la viabilidad de la estructura propuesta.

Un caso particular se encontró al observar los resultados de la simulación del *Modelo C* obtenidos cuando las concentraciones de hierro y calcio en el medio apical de los insertos eran de $0 \mu\text{M}$ de FAS y 3mM de CaCl_2 . En este caso las simulaciones muestran que entre los minutos 3 y 6 el modelo sobrestima la concentración de DMT1 en la membrana apical. Considerando que se desconocen los procesos que desencadenan tanto la endocitosis como el retorno de DMT1 a la membrana apical y que por ello no pueden incorporarse en el modelo planteado, para mejorar la predicción del modelo se obligó a este a que durante los primeros 3 minutos, sólo llevara a cabo la endocitosis de DMT1, y a que entre los minutos 3 y 11 sólo permitiera el retorno de DMT1 a la membrana. Los resultados cuando se fuerza la ocurrencia

exclusiva de los procesos de endocitosis o exocitosis durante los primeros minutos de la simulación muestran que la predicción del modelo tiene un comportamiento más cercano al de los datos experimentales. Por lo tanto, deben existir procesos que para el caso analizado, potencian la cinética de la endocitosis de DMT1 en los primeros minutos y que luego potencian sólo su exocitosis, pero estos no se incluyeron en el modelo debido al desconocimiento de la naturaleza de los mismos.

En resumen, fue posible desarrollar un modelo, el *Modelo C* que posee la capacidad de representar el movimiento de DMT1-1A/IRE(+) en las células Caco-2 asociado a la presencia de diferentes concentraciones de calcio extracelular y al proceso de captación de hierro no hemo. Las estrategias que se utilizaron para construir los modelos A y B propuestos en este capítulo, entregaron información valiosa para obtener el *Modelo C* final. Se necesitará realizar más trabajo experimental para determinar cómo varían las concentraciones de Fe^{2+} y Ca^{2+} tanto en el medio extracelular del compartimiento apical como en el citosol de las células Caco-2 e identificar los posibles mecanismos involucrados, y así incorporar esta información al modelo para mejorar su predicción, sin necesidad de, por ejemplo, obligar a que los procesos de endocitosis y retorno de DMT1 ocurran de manera exclusiva en diferentes intervalos de tiempo. Sin embargo, considerando la flexibilidad del *Modelo C* propuesto, en caso de ser necesario y según lo determinen los futuros hallazgos experimentales que se desarrollen en esta línea de investigación, podrían agregarse, modificarse o eliminarse reacciones con el fin de obtener un modelo fenomenológico que permita representar de la manera más precisa posible los datos experimentales del proceso de captación de hierro en presencia de diferentes concentraciones de calcio extracelular.

Capítulo 5: Conclusiones Generales

El objetivo de este trabajo de doctorado se centró en el análisis del efecto que tiene un desafío de hierro no hemo en el estado de hierro intracelular para las células Caco-2 cuando se realiza en presencia de diferentes concentraciones de calcio extracelular, la caracterización experimental del movimiento de los transportadores DMT1-1A/IRE(+) y FPN1 en las células Caco-2 polarizadas, inducido diferentes concentraciones de calcio extracelular en presencia o en ausencia de hierro no hemo extracelular, y el planteamiento de un modelo matemático que permita describir el movimiento de DMT1-1A/IRE(+) observado.

Las principales conclusiones obtenidas son:

- Para analizar el efecto del calcio extracelular e intracelular sobre la captación de hierro no hemo de las células Caco-2, se utilizó un ensayo de fluorescencia basado en el fluoróforo calceína, cuya fluorescencia se extingue en presencia de hierro, para detectar dinámicamente la entrada de hierro en el grupo de hierro lábil citosólico (cLIP). Según lo determinado por la extinción de la fluorescencia de la calceína, se mostró empíricamente que el calcio extracelular inhibe la captación de hierro por las células Caco-2 de una manera dependiente de la concentración.
- Se probó el efecto putativo de los niveles de calcio intracelular en la captación de hierro. La quelación del calcio intracelular con BAPTA no afectó la captación de hierro, lo que apoya la idea de que el efecto inhibitorio del calcio sobre la captación de hierro no se ejerce a través de la señalización del calcio intracelular, sino que es un efecto verdaderamente extracelular. Además, para asegurar que BAPTA produce un efecto amortiguador del Ca^{2+} intracelular cuando las células Caco-2 se exponen a altas concentraciones de Ca^{2+} extracelular, se utilizó tapsigargina (TAP) para aumentar la concentración de Ca^{2+} y Fluo-3, como indicador de la concentración de Ca^{2+} intracelular, encontrándose que BAPTA logra amortiguar eficazmente el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular después de la adición de TAP y, por lo tanto, también ante la presencia de una alta concentración de Ca^{2+} extracelular.
- Para estudiar la reversibilidad de los efectos del calcio extracelular en la captación de hierro, las células Caco-2 se lavaron después de preincubarlas durante 10 minutos con diferentes concentraciones de calcio y, posteriormente, se incubaron durante 10 minutos con $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} antes de comenzar la lectura de fluorescencia de calceína. Se probó que el calcio actúa como un inhibidor reversible ya que no se observaron diferencias significativas en el decaimiento de la fluorescencia de calceína cuando se realizó el paso de lavado después de incubar las células Caco-2 con $1,5 \text{ mM}$ o 3 mM de Ca^{2+} en comparación con las mediciones de fluorescencia de calceína obtenidas para las células que se preincubaron con $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} .
- Dadas las condiciones en las que se llevaron a cabo todos los experimentos de este trabajo, DMT1 es el único componente de transporte de hierro relevante que permanece en la membrana celular y puede interactuar con el hierro. Considerando esto, se desarrolló un modelo matemático basado en el esquema cinético de una inhibición reversible no competitiva donde Ca^{2+} se une a un sitio alostérico no catalítico de DMT1, utilizando un mecanismo de cuatro estados. Para ajustar los parámetros del modelo se utilizaron diferentes mediciones de fluorescencia de calceína como conjuntos de entrenamiento y de validación. Este modelo fue capaz de representar el efecto inhibitorio del calcio extracelular sobre la entrada de hierro

mediada por DMT1 en el grupo de hierro lábil citosólico de las células Caco-2, pues logró predecir con precisión la dinámica de extinción de la fluorescencia de calceína observada. Las simulaciones del modelo y las observaciones experimentales confirmaron el efecto inhibitorio del calcio extracelular sobre la entrada de hierro mediada por DMT1 en el cLIP de las células Caco-2.

- Para caracterizar experimentalmente mediante microscopía confocal el movimiento en tiempo real entre compartimentos celulares de DMT1-1A(+IRE) marcada con proteína fluorescente EGFP (DMT1-EGFP), y FPN marcada con proteína fluorescente TagRFP (FPN-TagRFP), inducido por la presencia de diferentes concentraciones de calcio extracelular, en presencia o en ausencia de un desafío de hierro no hemo extracelular, las células Caco-2 polarizadas cultivadas en insertos bicamerales se transfectaron de forma transitoria con los constructos pEGFP-C1-DMT1(1A/IRE(+)) y pTagRFP-C-FPN1 por lipofección. Se mostró que las mayores diferencias encontradas en la cinética de relocalización de los transportadores estudiados ante distintas concentraciones de calcio se encuentran para DMT1, ya que los cambios en los niveles de FPN en las membranas apicales y basales en la mayoría de los casos no fueron estadísticamente significativos. Se determinó que mientras mayor es la concentración de calcio extracelular a la cual se expone las células Caco-2 polarizadas, mayor es la reubicación de DMT1 en los dominios basales; en cambio, al reducir al mínimo esta concentración de calcio, la concentración apical de DMT1 aumenta significativamente. Por otro lado, cuando las células se exponen a hierro, se induce una relocalización de DMT1 a los compartimentos intracelulares, pero esta relocalización es más rápida cuando la concentración de Ca^{2+} extracelular es de $10 \mu\text{M}$ en comparación con 3 mM , favoreciéndose así la captación de hierro e intensificándose el proceso regulatorio de bloqueo de la mucosa en presencia de $10 \mu\text{M}$ de CaCl_2 , pues la internalización de estos transportadores desde el dominio apical es casi total cuando las células Caco-2 se exponen a hierro con concentraciones bajas de calcio. Por lo tanto, en esta investigación se comprobó por primera vez que el ciclo endocítico del transportador DMT1 en las células Caco-2 polarizadas está determinado no sólo por la presencia de hierro no hemo en el compartimiento apical, sino también por la concentración de calcio en ese compartimiento, demostrando que el efecto inhibitorio del calcio sobre la captación de hierro se ejerce sobre DMT1
- No se ha reportado evidencia de la relocalización de DMT1 y de FPN en el tiempo debida a la presencia de calcio extracelular, en presencia o ausencia de hierro. Los resultados presentados en esta investigación indican por primera vez que el ciclo endocítico del transportador DMT1 en las células Caco-2 polarizadas está determinado no sólo por la presencia de hierro en el compartimiento apical, sino también por la concentración de calcio en ese compartimiento. Los hallazgos obtenidos al realizar el seguimiento de la fluorescencia verde de DMT1-EGFP y roja de FPN-TagRFP con microscopía confocal, unidos a los obtenidos a partir de los experimentos con calceína-AM, sugieren que el calcio inhibió de manera no competitiva la captación de hierro mediada por DMT1 en células Caco-2.
- Los principales modelos reportados hasta ahora no consideran cómo la presencia de otro metal podría afectar el proceso de captación de hierro o cómo podrían modificar la ubicación del transportador DMT1. Se plantearon tres modelos fenomenológicos desarrollados para describir el movimiento de DMT1-1A/IRE(+) en las células Caco-

2 asociado a los cambios en la concentración de calcio extracelular en el medio apical y al proceso de captación de hierro no hemo, los cuales se generaron a partir de la información reportada en literatura y de la evidencia experimental obtenida en este trabajo. Los modelos fenomenológicos planteados en el desarrollo de este trabajo tienen en cuenta sólo los principales componentes biológicos del sistema ya que, la complejidad del proceso de transporte de hierro a través del enterocito, el cual requiere el funcionamiento coordinado de una serie de mecanismos biológicos que interactúan de una manera altamente compleja y que hasta la fecha no se comprenden completamente, no hace viable la inclusión de todos los factores que intervienen en el proceso. Los modelos consideraron una descripción de los estados de DMT1 en la membrana apical y su endocitosis para representar la dinámica de relocalización de DMT1 en la membrana apical observada experimentalmente en las células Caco-2.

El último modelo planteado, llamado *Modelo C*, considera que los procesos de endocitosis y retorno a la membrana apical de DMT1 dependen de si el transportador está o no unido a calcio, razón por la cual se incluyeron dos osciladores de Ball para representar a las vesículas que tienen en sus membranas al transportador DMT1 unido o no a Ca^{2+} ; además considera un estado de DMT1 en la membrana apical, que representa la fracción de este transportador unida tanto a hierro como a calcio. Los parámetros del *Modelo C* se identificaron como significativos a niveles de confianza del 95% (prueba *t*). El alto valor obtenido del coeficiente de determinación para cada caso estudiado indica que el *Modelo C* propuesto explica un alto porcentaje de la varianza experimental de los datos experimentales considerados. El *Modelo C* permitió describir cualitativa y cuantitativamente las principales características de la variación de la concentración de DMT1-1A/IRE(+) en la membrana apical de las células Caco-2 observadas experimentalmente, luego de modificar la concentración de calcio en el compartimiento apical de los insertos de las células Caco-2, con o sin la presencia de $10 \mu\text{M}$ de FAS, y además permite suministrar una interpretación biológica de los principales mecanismos implicados en el proceso de captación de hierro no hemo en presencia de diferentes concentraciones de calcio extracelular.

- Con base en los resultados presentados aquí, es posible especular que, si los suplementos de hierro y de calcio se toman juntos, el suplemento de calcio podría afectar negativamente la captación intestinal del hierro. Por lo tanto, debería ser recomendable que estos dos suplementos pudieran tomarse en diferentes momentos. Tanto la evidencia experimental presentada en este trabajo como el análisis de los resultados obtenidos utilizando los modelos matemáticos desarrollados, brindarán ayuda en la toma de decisiones sobre los planes de suplementación alimentaria de hierro y/o calcio, como, por ejemplo, en el desarrollo de suplementos dietéticos que contengan ambos minerales para lograr aumentar su consumo, especialmente en los grupos poblacionales que tienen ingestas inadecuadas de estos.
- Se necesitarán más esfuerzos para identificar el supuesto sitio inhibitorio del calcio en DMT1 que media la inhibición del calcio de la absorción de hierro. Por otro lado, los resultados presentados en esta investigación brindan un marco de análisis para identificar en investigaciones futuras los mecanismos del ciclo endocítico del hierro y el rol del calcio en ellos, así como los posibles aspectos que no han sido considerados o identificados aún en el sistema de absorción intestinal de hierro.

Bibliografía

- Abdi, H., & Williams L. (2010). Jackknife, in *Encyclopedia of Research Design* (Vol. 2). Thousand Oaks, California: Sage Publications.
- Abrams, S. A., Griffin, I. J., Davila, P., & Liang, L. (2001). Calcium fortification of breakfast cereal enhances calcium absorption in children without affecting iron absorption. *The Journal of Pediatrics*, 139(4), 522–526. doi:10.1067/mpd.2001.116936.
- Agarwal, R. (2007). Nonhematological Benefits of Iron. *American Journal of Nephrology*, 27(6), 565–571. doi:10.1159/000107927.
- Aguirre, P., Mena, N., Tapia, V., Arredondo, M., & Núñez, M. T. (2005). *BMC Neuroscience*, 6(1), 3. doi:10.1186/1471-2202-6-3.
- Aisen, P., Leibman, A., & Zweier, J. (1978). Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *Journal of Biological Chemistry*, 253(6), 1930–1937. doi:10.1016/s0021-9258(19)62337-9.
- Allen, M.B., Isaacson, E. (1998). *Numerical Analysis for Applied Science*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., p. 188-194.
- Allen, L. H. (1997). Pregnancy and Iron Deficiency: Unresolved Issues. *Nutrition Reviews*, 55(4), 91–101. doi:10.1111/j.1753-4887.1997.tb06460.x.
- Alorabi, A.Q., Abdelbaset, M., Zabin, S.A. (2019). Colorimetric Detection of Multiple Metal Ions Using Schiff Base 1-(2-Thiophenylimino)-4-(N-dimethyl)benzene. *Chemosensors*: 8(1), 1-10. doi:10.3390/chemosensors8010001.
- Altay G, Larrañaga E, Tosi S, Barriga FM, Batlle E, Fernández-Majada V, Martínez E. Self-organized intestinal epithelial monolayers in crypt and villus-like domains show effective barrier function. *Sci Rep*. 2019 Jul 12;9(1):10140. doi: 10.1038/s41598-019-46497-x. Erratum in: *Sci Rep*. 2019 Dec 6;9(1):18822. PMID: 31300688; PMCID: PMC6625996.
- Alvarez-Hernandez, X., Nichols, G. M., & Glass, J. (1991). Caco-2 cell line: a system for studying intestinal iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1070(1), 205–208. doi:10.1016/0005-2736(91)90165-5.
- Alvarez-Hernandez, X., Smith, M., & Glass, J. (1998). The Effect of Apotransferrin on Iron Release From Caco-2 Cells, an Intestinal Epithelial Cell Line. *Blood*, 91(10), 3974-3979. doi: 10.1182/blood.V91.10.3974.
- Andrews, N. C. (1999). Disorders of Iron Metabolism. *New England Journal of Medicine*, 341(26), 1986–1995. doi:10.1056/nejm199912233412607.
- Anderson, J. J. B. (2001). Calcium Requirements during Adolescence to Maximize Bone Health. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(2), 186S–191S. doi:10.1080/07315724.2001.10719030.
- Andrews, N. C. (2008). Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*, 112(2), 219–230. doi:10.1182/blood-2007-12-077388.
- Andrews, M., Briones, L., Jaramillo, A., Pizarro, F., & Arredondo, M. (2014). Effect of Calcium, Tannic Acid, Phytic Acid and Pectin over Iron Uptake in an In Vitro Caco-2 Cell Model. *Biological Trace Element Research*, 158(1), 122–127. doi:10.1007/s12011-014-9911-0.
- Appleby, P. A., Shabir, S., Southgate, J., & Walker, D. (2013). A theoretical model of cytosolic calcium elevation following wounding in urothelial cell monolayers.

- Journal of Physics: Conference Series, 410, 012168. doi:10.1088/1742-6596/410/1/012168.
- Aron, A.T., Heffern, M.C., Lonergan, Z.R., Vander Wal, M.N., Blank, B.R., Spangler, B., Zhang, Y., Park, H.M., Stahl, A., Renslo, A.R., Skaar, E.P., Chang, C.J. (2017). In vivo bioluminescence imaging of labile iron accumulation in a murine model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*:114(48), 12669-12674. doi: 10.1073/pnas.1708747114.
- Arredondo, M., & Núñez, M. T. (2005). Iron and copper metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4-5), 313–327. doi:10.1016/j.mam.2005.07.010.
- Arredondo, M., Tapia, V., Rojas, A., Aguirre, P., Reyes, F., Marzolo, M. P., & Núñez, M. T. (2006). Apical distribution of HFE-β2-microglobulin is associated with inhibition of apical iron uptake in intestinal epithelia cells. *BioMetals*, 19(4), 379–388. doi:10.1007/s10534-005-6687-x.
- Arredondo, M., Kloosterman, J., Núñez, S., Segovia, F., Candia, V., Flores, S., Le Blanc, S., Olivares, M., & Pizarro, F. (2008). Heme Iron Uptake by Caco-2 Cells is a Saturable, Temperature Sensitive and Modulated by Extracellular pH and Potassium. *Biological Trace Element Research*, 125(2), 109–119. doi:10.1007/s12011-008-8161-4.
- Asemi, Z., Saneei, P., Sabihi, S.-S., Feizi, A., & Esmailzadeh, A. (2015). Total, dietary, and supplemental calcium intake and mortality from all-causes, cardiovascular disease, and cancer: A meta-analysis of observational studies. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 25(7), 623–634. doi:10.1016/j.numecd.2015.03.008.
- Au, A. P., & Reddy, M. B. (2000). Caco-2 Cells Can Be Used to Assess Human Iron Bioavailability from a Semipurified Meal. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1329–1334. doi:10.1093/jn/130.5.1329.
- Bach Kristensen, M., Tetens, I., Alstrup Jørgensen, A. B., Dal Thomsen, A., Milman, N., Hels, O., Sandstrom B., Hansen, M. (2005). A decrease in iron status in young healthy women after long-term daily consumption of the recommended intake of fibre-rich wheat bread. *European Journal of Nutrition*, 44(6), 334–340. doi:10.1007/s00394-004-0529-4
- Bae, J. H., Rubini, M., Jung, G., Wiegand, G., Seifert, M. H. J., Azim, M. K., Kim, J. S., Zumbusch, A., Holak, T. A., Moroder, L., Huber, R., Budisa, N. (2003). Expansion of the Genetic Code Enables Design of a Novel “Gold” Class of Green Fluorescent Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 328(5), 1071–1081. doi:10.1016/s0022-2836(03)00364-4.
- Baker, E. N., & Lindley, P. F. (1992). New perspectives on the structure and function of transferrins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 47(1), 147–160. doi:10.1016/0162-0134(92)84061-q.
- Ball, P. (1996). *Designing the Molecular World: Chemistry at the Frontier*, tomo 7. Princeton University Press.
- Barton, J. C., Conrad, M. E., & Parmley, R. T. (1983). Calcium inhibition of inorganic iron absorption in rats. *Gastroenterology*, 84(1), 90-101.
- Bæch, S. B., Hansen, M., Bukhave, K., Jensen, M., Sørensen, S. S., Kristensen, L., Purslow, P. P., & Skibsted, L. H., Sandström, B. (2003). Nonheme-iron absorption from a phytate-rich meal is increased by the addition of small amounts of pork meat. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(1), 173–179. doi:10.1093/ajcn/77.1.173.

- Beck, K. L., & Coad, J. (2017). Dairy Product (Calcium) Consumption and Iron Nutrition. *Nutrients in Dairy and Their Implications on Health and Disease*, 149–160. doi:10.1016/b978-0-12-809762-5.00012-7.
- Bender, E.A. (2012). *An Introduction to Mathematical Modeling* (1ra Ed.). Dover Publishing Company: Mineola, New York. ISBN: 978-0486411804.
- Benkhedda, K., L'Abbé, M. R., & Cockell, K. A. (2010). Effect of calcium on iron absorption in women with marginal iron status. *British Journal of Nutrition*, 103(05), 742–748. doi:10.1017/s0007114509992418.
- Benson, D.M., Bryan, J., Plant, A.L., Gotto, A.M.Jr, Smith, L.C. (1985). Digital imaging fluorescence microscopy: spatial heterogeneity of photobleaching rate constants in individual cells. *J Cell Biol*, 100(4):1309-23. doi: 10.1083/jcb.100.4.1309. PMID: 3920227; PMCID: PMC2113759.
- Berchner-Pfannschmidt, U., Petrat, F., Doege, K., Trinidad, B., Freitag, P., Metzen, E., de Groot, H., & Fandrey, J. (2004). Chelation of Cellular Calcium Modulates Hypoxia-inducible Gene Expression through Activation of Hypoxia-inducible Factor-1 α . *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44976–44986. doi:10.1074/jbc.m313995200.
- Bernhardi, R., & Inestrosa, N. (2008). *Neurodegenerative Diseases: From Molecular Concepts to Therapeutic Targets*. New York: Nova Biomedical.
- Besarab, A., DeGuzman, A., & Swanson, J. W. (1981). Effect of albumin and free calcium concentrations on calcium binding in vitro. *Journal of Clinical Pathology*, 34(12), 1361–1367. doi:10.1136/jcp.34.12.1361.
- Bhagavan, N.V., Ha, C.E. (2015) *Enzymes and Enzyme Regulation*. In: *Essentials of Medical Biochemistry*. 2nd ed. Academic Press, 2015, p. 63-84.
- Billesbølle, C.B., Azumaya, C.M., Kretsch, R.C., Powers, A.S., Gonen, S., Schneider, S., Arvedson, T., Dror, R.O., Cheng, Y. & Manglik, A. (2020). Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. *Nature*, 586(7831):807-811. doi: 10.1038/s41586-020-2668-z.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. doi:10.1097/wox.0b013e3182439613.
- Björn-Rasmussen, E., Hallberg, L., & Arvidsson, B. (1974). Food iron absorption in man. Applications of the two-pool extrinsic tag method to measure heme and nonheme iron absorption from the whole diet. *J Clin Invest*, 53(1), 247-55. doi: 10.1172/JCI107545.
- Blat, Y. (2010). Non-Competitive Inhibition by Active Site Binders. *Chem Biol Drug Des*: 75(6), 535-540. doi: 10.1111/j.1747-0285.2010.00972.x.
- Borawski, J., Lindeman, A., Buxton, F., Labow, M., & Gaither, L. A. (2007). Optimization Procedure for Small Interfering RNA Transfection in a 384-Well Format. *Journal of Biomolecular Screening*, 12(4), 546–559. doi:10.1177/1087057107300172.
- Borst, J. W., Hink, M. A., van Hoek, A., & Visser, A. J. W. G. (2005). Effects of Refractive Index and Viscosity on Fluorescence and Anisotropy Decays of Enhanced Cyan and Yellow Fluorescent Proteins. *Journal of Fluorescence*, 15(2), 153–160. doi:10.1007/s10895-005-2523-5.
- Bozym, R. A., Morosky, S. A., Kim, K. S., Cherry, S., & Coyne, C. B. (2010). Release of Intracellular Calcium Stores Facilitates Coxsackievirus Entry into Polarized Endothelial Cells. *PLoS Pathogens*, 6(10), e1001135. doi:10.1371/journal.ppat.1001135.

- Bozym, R.A., Patel, K., White, C., Cheung, K.H., Bergelson, J.M., Morosky, S.A., Coyne, C.B. (2011). Calcium signals and calpain-dependent necrosis are essential for release of coxsackievirus B from polarized intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell*: 22(17), 3010-3021. doi: 10.1091/mbc.E11-02-0094.
- Braut-Boucher, F., Pichon, J., Rat, P., Adolphe, M., Aubery, M., & Font, J. (1995). A non-isotopic, highly sensitive, fluorimetric, cell-cell adhesion microplate assay using calcein AM-labeled lymphocytes. *Journal of Immunological Methods*, 178(1), 41–51. doi:10.1016/0022-1759(94)00239-s.
- Breuer, W., Epsztejn, S., Millgram, P., & Cabantchik, I. Z. (1995). Transport of iron and other transition metals into cells as revealed by a fluorescent probe. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 268(6), C1354–C1361. doi:10.1152/ajpcell.1995.268.6.c1354.
- Breuer, W., Shvartsman, M., & Cabantchik, Z. I. (2008). Intracellular labile iron. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), 350–354. doi:10.1016/j.biocel.2007.03.010.
- Bricks, T., Paullier, P., Legendre, A., Fleury, M.-J., Zeller, P., Merlier, F., Anton, P., & Leclerc, E. (2014). Development of a new microfluidic platform integrating co-cultures of intestinal and liver cell lines. *Toxicology in Vitro*, 28(5), 885–895. doi:10.1016/j.tiv.2014.02.005.
- Briske-Anderson, M. J., Finley, J. W., & Newman, S. M. (1997). The Influence of Culture Time and Passage Number on the Morphological and Physiological Development of Caco-2 Cells. *Experimental Biology and Medicine*, 214(3), 248–257. doi:10.3181/00379727-214-44093. PMID: 9083258.
- Brown, J. X., Buckett, P. D., & Wessling-Resnick, M. (2004). Identification of Small Molecule Inhibitors that Distinguish between Non-Transferrin Bound Iron Uptake and Transferrin-Mediated Iron Transport. *Chemistry & Biology*, 11(3), 407–416. doi:10.1016/j.chembiol.2004.02.016.
- Brownlie, T., Utermohlen, V., Hinton, P. S., & Haas, J. D. (2004). Tissue iron deficiency without anemia impairs adaptation in endurance capacity after aerobic training in previously untrained women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(3), 437–443. doi:10.1093/ajcn/79.3.437.
- Brune, M., Rossander, L., & Hallberg, L. (1989). Iron-absorption and phenolic compounds - importance of different phenolic structures. *Eur J Clin Nutr*, 43(8), 547–558.
- Burdo, J. R., Menzies, S. L., Simpson, I. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D., Dolan, K. G., Haile, D. J., Beard, J. L., & Connor, J. R. (2001). Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J. Neurosci. Res*, 66(6), 1198–1207. doi: 10.1002/jnr.1256.
- Burnham, K.P., & Anderson, D.R. (2002). *Model Selection and Multimodel Inference* (2a ed.). New York: Springer-Verlag. doi: 10.1007/b97636.
- Cable, J. W., Cable, E. E., & Bonkovsky, H. L. (1993). Induction of heme oxygenase in intestinal epithelial cells: studies in Caco-2 cell cultures. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 129(1), 93–98. doi:10.1007/bf00926580.
- Cai, Q., Chandler, J. S., Wasserman, R. H., Kumar, R., & Penniston, J. T. (1993). Vitamin D and adaptation to dietary calcium and phosphate deficiencies increase intestinal plasma membrane calcium pump gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(4), 1345–1349. doi:10.1073/pnas.90.4.1345.

- Cajanko, M. M., Marušić, M., Kisovec, M., Rojko, N., Benčina, M., Caserman, S., & Anderluh, G. (2015). Listeriolysin O Affects the Permeability of Caco-2 Monolayer in a Pore-Dependent and Ca²⁺-Independent Manner. *PLoS ONE* 10(6): e0130471. doi:10.1371/journal.pone.0130471.
- Campillos, M., Cases, I., Hentze, M. W., & Sanchez, M. (2010). SIREs: searching for iron-responsive elements. *Nucleic Acids Res*, 38, 360–367. doi:10.1093/nar/gkq371.
- Candelaria, P. V., Leoh, L. S., Penichet, M. L. & Daniels-Wells, T. R. (2021). Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-cancer Agents. *Frontiers in Immunology*, 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.607692.
- Candia, V., Ríos-Castillo, I., Carrera-Gil, F., Vizcarra, B., Olivares, M., Chaniotakis, S., & Pizarro, F. (2018). Effect of various calcium salts on non-heme iron bioavailability in fasted women of childbearing age. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 49, 8–12. doi:10.1016/j.jtemb.2018.04.029.
- Canonne-Hergaux, F., Gruenheid, S., Ponka, P. & Gros, P. (1999). Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* 93, 4406–4417.
- Cassat, J. E., & Skaar, E. P. (2013). Iron in Infection and Immunity. *Cell Host & Microbe*, 13(5), 509–519. doi:10.1016/j.chom.2013.04.010.
- Cediel Giraldo, G., Castaño Moreno, E., & Gaitán Charry, D. (2016). Doble carga de malnutrición durante el crecimiento: ¿una realidad latente en colombia? *Revista de Salud Pública*, 18(4), 656. doi:10.15446/rsap.v18n4.47769.
- Cegarra, L., Colins, A., Gerdtzen, Z. P., Nuñez, M. T., & Salgado, J. C. (2019). Mathematical modeling of the relocation of the divalent metal transporter DMT1 in the intestinal iron absorption process. *PLOS ONE*, 14(6), e0218123. doi:10.1371/journal.pone.0218123.
- Cermak, J., Balla, J., Jacob, H. S., Balla, G., Enright, H., Nath, K., & Vercellotti, G. M. (1993). Tumor cell heme uptake induces ferritin synthesis resulting in altered oxidant sensibility: possible role in chemotherapy efficacy. *Cancer Res* 53:5308–5313.
- Chapman, D. G., & Campbell, J. A. (1957). Effect of calcium and phosphorus salts on the utilization of iron by anaemic rats. *British Journal of Nutrition*, 11(02), 127. doi:10.1079/bjn19570026.
- Chaudhry, H. W., Richards-Kortum, R., Kolubayev, T., Kittrell, C., Partovi, F., Kramer, J. R., & Feld, M. S. (1989). Alteration of spectral characteristics of human artery wall caused by 476-nm laser irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine*, 9(6), 572–580. doi:10.1002/lsm.1900090606. PMID: 2601550.
- Chen, B., Yoo, K., Xu, W., Pan, R., Han, X. X., & Chen, P. (2017). Characterization and evaluation of a peptide-based siRNA delivery system in vitro. *Drug Delivery and Translational Research*, 7(4), 507–515. doi:10.1007/s13346-017-0371-x. PMID: 28349343.
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S. C., & Walz, T. (2004). Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. *Cell*, 116(4), 565–576. doi:10.1016/s0092-8674(04)00130-8.
- Chepda, T., Cadau, M., Girin, P., Frey, J., & Chamson, A. (2001). Monitoring of ascorbate at a constant rate in cell culture: effect on cell growth. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 37(1), 26. doi:10.1290/1071-2690(2001)037<0026:moaac>2.0.co;2.

- Chifman, J., Laubenbacher, R., & Torti, S. V. (2014). A Systems Biology Approach to Iron Metabolism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 201–225. doi:10.1007/978-1-4939-2095-2_10.
- Choi, D.-W., Lee, J.-H., Chun, H.-H., & Song, K. B. (2012). Isolation of a calcium-binding peptide from bovine serum protein hydrolysates. *Food Science and Biotechnology*, 21(6), 1663–1667. doi:10.1007/s10068-012-0221-z.
- Chon, D.A., Reisman, T., Weinreb, J.E., Hershman, J.M., Leung, A.M. (2018). Concurrent Milk Ingestion Decreases Absorption of Levothyroxine. *Thyroid*: 28(4), 454-457, 2018. doi: 10.1089/thy.2017.0428.
- Christakos, S., Dhawan, P., Porta, A., Mady, L. J., & Seth, T. (2011). Vitamin D and intestinal calcium absorption. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 347(1-2), 25–29. doi:10.1016/j.mce.2011.05.038.
- Christakos, S. (2012). Recent advances in our understanding of 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulation of intestinal calcium absorption. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 523(1), 73–76. doi:10.1016/j.abb.2011.12.020.
- Chung, B., Chaston, T., Marks, J., Srail, S. K., & Sharp, P. A. (2009). Heparin Decreases Iron Transporter Expression in Vivo in Mouse Duodenum and Spleen and in Vitro in THP-1 Macrophages and Intestinal Caco-2 Cells. *The Journal of Nutrition*, 139(8), 1457–1462. doi:10.3945/jn.108.102905.
- Cianetti, L., Segnalini, P., Calzolari, A., Morsilli, O., Felicetti, F., Ramoni, C., Gabbianelli, M., Testa, U., Sposi, N. M. (2005). Expression of alternative transcripts of ferroportin-1 during human erythroid differentiation. *Haematologica*, 90(12), 1595–1606.
- Claeskens, G., & Hjort, N.L. (2008). *Model Selection and Model Averaging*. New York: Cambridge University Press.
- Colli Franzone, P., Paganuzzi, A., & Stefanelli, M. (1982). A mathematical model of iron metabolism. *Journal of Mathematical Biology*, 15(2), 173–201. doi:10.1007/bf00275072.
- Colins, A., Gerdtzen, Z. P., Nuñez, M. T., & Salgado, J. C. (2017). Mathematical Modeling of Intestinal Iron Absorption Using Genetic Programming. *PLOS ONE*, 12(1), e0169601. doi:10.1371/journal.pone.0169601.
- Cook, J. D., Morck, T. A., & Lynch, S. R. (1981). The inhibitory effect of soy products on nonheme iron absorption in man. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(12), 2622–2629. doi:10.1093/ajcn/34.12.2622.
- Cook, J. D., Dassenko, S. A., & Whittaker, P. (1991). Calcium supplementation: effect on iron absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(1), 106–111. doi:10.1093/ajcn/53.1.106.
- Cook, J. D., Reddy, M. B., & Hurrell, R. F. (1995). The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(4), 800–804. doi:10.1093/ajcn/61.4.800.
- Cotlet, M., Hofkens, J., Maus, M., Gensch, T., Van der Auweraer, M., Michiels, J., Dirix, G., Van Guyse, M., Vanderleyden, J., Visser, A.J.W.G., & De Schryver, F. C. (2001). Excited-State Dynamics in the Enhanced Green Fluorescent Protein Mutant Probed by Picosecond Time-Resolved Single Photon Counting Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(21), 4999–5006. doi:10.1021/jp003813i.
- Courtois, F., Suc, I., Garofalo, C., Ledoux, M., Seidman, E., & Levy, E. (2000). Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins.

- American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 279(1), G12–G19. doi:10.1152/ajpgi.2000.279.1.g12.
- Crichton, R. R., & Charlotiaux-Wauters, M. (1987). Iron transport and storage. *European Journal of Biochemistry*, 164(3), 485–506. doi:10.1111/j.1432-1033.1987.tb11155.x.
- Crosby, W. H. (1966). Mucosal block. An evaluation of concepts relating to control of iron absorption. *Semin Hematol*, 3(4), 299-313.
- Cui, X, Luo Y, Li C, Li Y, Wang Z. (2015). Changes of intracellular Ca²⁺ in quercetin-induced autophagy progression. *Acta Biochim Biophys Sin*: 47(11), 908-914. doi: 10.1093/abbs/gmv096.
- Daniels, T. R., Delgado, T., Rodriguez, J. A., Helguera, G., & Penichet, M. L. (2006). The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clinical Immunology*, 121(2), 144–158. doi:10.1016/j.clim.2006.06.010.
- Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E.C., Tilkins, M.L., Price, P.J., Ciccarone, V.C. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*, 33(2):95-103. doi: 10.1016/j.ymeth.2003.11.023. PMID: 15121163.
- Darnton-Hill, I. (1998). Overview: Rationale and Elements of a Successful Food-Fortification Programme. *Food and Nutrition Bulletin*, 19(2), 92–100. doi:10.1177/156482659801900202.
- Dasa, F., & Abera, T. (2018). Factors Affecting Iron Absorption and Mitigation Mechanisms: A review. *Int J Agric Sc Food Technol* 4(1): 024-030. doi:10.17352/2455-815X.000033.
- Davies, S. L., Gibbons, C. E., Steward, M. C., & Ward, D. T. (2008). Extracellular calcium- and magnesium-mediated regulation of passive calcium transport across Caco-2 monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(10), 2318–2324. doi:10.1016/j.bbamem.2008.05.013.
- Dawson-Hughes, B., Seligson, F. H., & Hughes, V. A. (1986). Effects of calcium carbonate and hydroxyapatite on zinc and iron retention in postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 44(1), 83–88. doi:10.1093/ajcn/44.1.83.
- Deaglio, S. (2002). Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood*, 100(10), 3782–3789. doi:10.1182/blood-2002-01-0076.
- Dean, K. M., Lubbeck, J. L., Binder, J. K., Schwall, L. R., Jimenez, R., & Palmer, A. E. (2011). Analysis of Red-Fluorescent Proteins Provides Insight into Dark-State Conversion and Photodegradation. *Biophysical Journal*, 101(4), 961–969. doi:10.1016/j.bpj.2011.06.055. PMID: 21843488; PMCID: PMC3175071.
- Deb, S., Johnson, E.E., Robalinho-Teixeira, R.L., Wessling-Resnick, M. (2009). Modulation of intracellular iron levels by oxidative stress implicates a novel role for iron in signal transduction. *Biometals*: 22(5), 855-862. doi: 10.1007/s10534-009-9214-7.
- De Domenico, I., McVey, W. D., 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(7), 2569–2578. doi:10.1091/mbc.e07-01-0060.
- De Domenico, I., McVey Ward, D., & Kaplan, J. (2008). Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 72–81. doi:10.1038/nrm2295.

- Deehr, M. S., Dallal, G. E., Smith, K. T., Taulbee, J. D., & Dawson-Hughes, B. (1990). Effects of different calcium sources on iron absorption in postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51(1), 95–99. doi:10.1093/ajcn/51.1.95.
- Delaby, C. (2005). Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood*, 106(12), 3979–3984. doi:10.1182/blood-2005-06-2398.
- Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration and Center for Drug Evaluation and Research (U.S.). (2017). Guidance for Industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutical classification system. Silver Spring, MD: Center for Drug Evaluation and Research, 1–16. <https://collections.nlm.nih.gov/catalog/nlm:nlmuid-101720038-pdf>. Revisado el 11 de septiembre de 2022.
- Deshpande, C. N., Ruwe, T.A., Shawki, A., Xin, V., Vieth, K. R., Valore, E. V., Qiao, B., Ganz, T., Nemeth, E., Mackenzie, B., & Jormakka, M. (2018). Calcium is an essential cofactor for metal efflux by the ferroportin transporter family. *Nat Commun*, 9(1), 3075. doi: 10.1038/s41467-018-05446-4.
- Devalia, V., Carter, K., Walker, A. P., Perkins, S. J., Worwood, M., May, A., & Dooley, J. S. (2002). Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3-base pair deletion in the ferroportin 1 gene (SLC11A3). *Blood*, 100(2), 695-697.
- di Patti, M. C., Persichini, T., Mazzone, V., Polticelli, F., Colasanti, M., & Musci, G. (2004). Interleukin-1beta up-regulates iron efflux in rat C6 glioma cells through modulation of ceruloplasmin and ferroportin-1 synthesis. *Neurosci Lett*, 363(2), 182-186. doi: 10.1016/j.neulet.2004.04.005.
- di Patti, M. C., Polticelli, F., Cece, G., Cutone, A., Felici, F., Persichini, T., & Musci, G. (2014). A structural model of human ferroportin and of its iron binding site. *The FEBS Journal*, 281(12), 2851-2860. doi:10.1111/febs.12825.
- Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 2013;3(4):461-91. doi: 10.3233/JPD-130230.
- Donovan, A., Lima, C.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Zon, L.I., Robine, S., Andrews, N.C. (2005). The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.*, 1(3):191-200. doi: 10.1016/j.cmet.2005.01.003. PMID: 16054062.
- Drakesmith, H., Nemeth, E., & Ganz, T. (2015). Ironing out ferroportin. *Cell Metab*, 22(5), 777–787. doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.006.
- Efron, B. (1982). *The Jackknife, the Bootstrap, And Other Resampling Plans*. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, vol. 38. Society for Industrial and Applied Mathematics (SIAM).
- Ehrnstorfer, I. A., Geertsma, E. R., Pardon, E., Steyaert, J., & Dutzler, R. (2014). Crystal structure of a SLC11 (NRAMP) transporter reveals the basis for transition-metal ion transport. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(11), 990–996. doi:10.1038/nsmb.2904.
- Eisenstein, R. S., & Ross, K. L. (2003). Novel roles for iron regulatory proteins in the adaptive response to iron deficiency. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1510S–1516S. doi: 10.1093/jn/133.5.1510S.
- Elsner, C., & Bohne, J. (2017). The retroviral vector family: something for everyone. *Virus Genes*, 53(5), 714–722. doi:10.1007/s11262-017-1489-0. PMID: 28762206.

- Enculescu, M., Metzendorf, C., Sparla, R., Hahnel, M., Bode, J., Muckenthaler, M. U., & Legewie, S. (2017). Modelling Systemic Iron Regulation during Dietary Iron Overload and Acute Inflammation: Role of Hepcidin-Independent Mechanisms. *PLOS Computational Biology*, 13(1), e1005322. doi:10.1371/journal.pcbi.1005322.
- Esparza, A., Gerdtzen, Z. P., Olivera-Nappa, A., Salgado, J. C., & Núñez, M. T. (2015). Iron-induced reactive oxygen species mediate transporter DMT1 endocytosis and iron uptake in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 309(8), C558–C567. doi:10.1152/ajpcell.00412.2014.
- Estrada, M., Espinosa A, Gibson CJ, Uhlen P, Jaimovich E. (2005). Capacitative calcium entry in testosterone-induced intracellular calcium oscillations in myotubes. *J Endocrinol*: 184(2), 371-379. doi: 10.1677/joe.1.05921.
- Even, M. S., Sandusky, C. B., & Barnard, N. D. (2006). Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105–108. doi:10.1016/j.tibtech.2006.01.001. PMID: 16427150.
- Ewert, K. K., Zidovska, A., Ahmad, A., Boussein, N. F., Evans, H. M., McAllister, C. S., Samuel, C. E., Safinya, C. R. (2010). Cationic Liposome–Nucleic Acid Complexes for Gene Delivery and Silencing: Pathways and Mechanisms for Plasmid DNA and siRNA. *Nucleic Acid Transfection*, 191–226. doi:10.1007/128_2010_70. PMID: PMC3867951.
- Facchinetti, S. (2009). A Procedure to Find Exact Critical Values of Kolmogorov-Smirnov Test. *J Appl Stat*: 21 (3-4), 337-359.
- Ferrell, J. E., Tsai, T. Y.-C., & Yang, Q. (2011). Modeling the Cell Cycle: Why Do Certain Circuits Oscillate? *Cell*, 144(6), 874–885. doi:10.1016/j.cell.2011.03.006.
- Fleming, M. D., Romano, M. A., Su, M. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D. & Andrews, N.C. (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(3), 1148–1153. doi: 10.1073/pnas.95.3.1148.
- Frazer, D. M., Wilkins, S. J., Becker, E. M., Murphy, T. L., Vulpe, C. D., McKie, A. T., & Anderson, G. J. (2003). A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. *Gut*, 52(3), 340–346. doi:10.1136/gut.52.3.340.
- Freshney, R.I. (2015). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 7th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Frikke-Schmidt, H., & Lykkesfeldt, J. (2010). Keeping the intracellular vitamin C at a physiologically relevant level in endothelial cell culture. *Analytical Biochemistry*, 397(1), 135–137. doi:10.1016/j.ab.2009.09.040.
- Fujisaki, H., Futaki, S., Yamada, M., Sekiguchi, K., Hayashi, T., Ikejima, T., & Hattori, S. (2018). Respective optimal calcium concentrations for proliferation on type I collagen fibrils in two keratinocyte line cells, HaCaT and FEPE1L-8. *Regenerative Therapy*, 8, 73–79. doi:10.1016/j.reth.2018.04.001.
- Fullmer, C. S. (1992). Intestinal Calcium Absorption: Calcium Entry. *The Journal of Nutrition*, 122(suppl_3), 644–650. doi:10.1093/jn/122.suppl_3.644.
- Fus-Kujawa, A., Prus, P., Bajdak-Rusinek, K., Teper, P., Gawron, K., Kowalczyk, A., Sieron, A.L. (2021). An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Front Bioeng Biotechnol*, 9:701031. doi: 10.3389/fbioe.2021.701031. PMID: 34354988; PMID: PMC8330802.

- Gaitán, D. A., Flores, S., Pizarro, F., Olivares, M., Suazo, M., & Arredondo, M. (2011). The Effect of Calcium on Non-heme Iron Uptake, Efflux, and Transport in Intestinal-like Epithelial Cells (Caco-2 Cells). *Biological Trace Element Research*, 145(3), 300–303. doi:10.1007/s12011-011-9207-6.
- Gaitán, D., Flores, S., Saavedra, P., Miranda, C., Olivares, M., Arredondo, M., López de Romaña, D., Lönnnerdal, B., & Pizarro, F. (2011b). Calcium Does Not Inhibit the Absorption of 5 Milligrams of Nonheme or Heme Iron at Doses Less Than 800 Milligrams in Nonpregnant Women. *The Journal of Nutrition*, 141(9), 1652–1656. doi:10.3945/jn.111.138651.
- Galan, P., Cherouvrier, F., Preziosi, P., & Hercberg, S. (1991). Effects of the increasing consumption of dairy products upon iron absorption. *European Journal of Clinical Nutrition*, 45(11), 553–559.
- Ganz, T., & Nemeth, E. (2012). Iron Metabolism: Interactions with Normal and Disordered Erythropoiesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(5), a011668–a011668. doi:10.1101/cshperspect.a011668.
- Ganz, T. (2013). Systemic Iron Homeostasis. *Physiological Reviews*, 93(4), 1721–1741. doi:10.1152/physrev.00008.2013.
- Ganz, T. (2017). Does Pathological Iron Overload Impair the Function of Human Lungs? *EBioMedicine*, 20, 13–14. doi:10.1016/j.ebiom.2017.05.023.
- Gao, X., & Huang, L. (1995). Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 2(10):710-22. PMID: 8750010.
- García-Casal, M. N., Layrisse, M., Solano, L., Barón, M. A., Arguello, F., Llovera, D., Ramírez, L., Leets, I. & Tropper, E. (1998). Vitamin A and β -Carotene Can Improve Nonheme Iron Absorption from Rice, Wheat and Corn by Humans. *The Journal of Nutrition*, 128(3), 646–650. doi:10.1093/jn/128.3.646.
- García-Casal, M. N., Leets, I., & Layrisse, M. (2000). β -Carotene and Inhibitors of Iron Absorption Modify Iron Uptake by Caco-2 Cells. *The Journal of Nutrition*, 130(1), 5–9. doi:10.1093/jn/130.1.5.
- Garrick, MD, Dolan KG, Horbinski C, Ghio AJ, Higgins D, Porubcin M, Moore EG, Hainsworth LN, Umbreit JN, Conrad ME, Feng L, Lis A, Roth JA, Singleton S, Garrick LM. (2003): DMT1: a mammalian transporter for multiple metals. *Biomaterials*: 16(1), 41-54. doi: 10.1023/a:1020702213099.
- Gaur, S., & Miller, D. D. (2015) Is Indian tea (chai) detrimental to dietary iron absorption? *International Food Research Journal*, 22(3), 1002-1008.
- Geyer, P. E., Holdt, L. M., Teupser, D., & Mann, M. (2017). Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Molecular Systems Biology*, 13(9), 942. doi:10.15252/msb.20156297. PMID: 28951502; PMCID: PMC5615924.
- Gigout, A., Jolicoeur, M., & Buschmann, M. D. (2005). Low calcium levels in serum-free media maintain chondrocyte phenotype in monolayer culture and reduce chondrocyte aggregation in suspension culture. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(11), 1012–1024. doi:10.1016/j.joca.2005.06.003.
- Giraud, C. (2021). *Introduction to High-Dimensional Statistics* (2nd ed.). New York: Chapman and Hall/CRC. doi :10.1201/9781003158745.
- Gkouvatsos, K., Papanikolaou, G., & Pantopoulos, K. (2012). Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(3), 188–202. doi:10.1016/j.bbagen.2011.10.013.

- Glahn, R. P., Lee, O. A., Yeung, A., Goldman, M. I., & Miller, D. D. (1998). Caco-2 Cell Ferritin Formation Predicts Nonradiolabeled Food Iron Availability in an In Vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture Model. *The Journal of Nutrition*, 128(9), 1555–1561. doi:10.1093/jn/128.9.1555.
- Gleerup, A., Rossander-Hultén, L., & Hallberg, L. (1993). Duration of the inhibitory effect of calcium on non-haem iron absorption in man. *Eur J Clin Nutr*, 47(12), 875-879.
- Gleerup, A., Rossander-Hulthén, L., Gramatkovski, E., & Hallberg, L. (1995). Iron absorption from the whole diet: comparison of the effect of two different distributions of daily calcium intake. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(1), 97–104. doi:10.1093/ajcn/61.1.97.
- Glover, D. J., Lipps, H. J., & Jans, D. A. (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nature Reviews Genetics*, 6(4), 299–310. doi:10.1038/nrg1577. PMID: 15761468.
- Gomme, P. T., McCann, K. B., & Bertolini, J. (2005). Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today*, 10(4), 267–273. doi:10.1016/s1359-6446(04)03333-1.
- Gonze D, & Hafner M. (2010). Positive Feedbacks Contribute to the Robustness of the Cell Cycle with Respect to Molecular Noise. En: in *Advances in the Theory of Control, Signals and Systems with Physical Modeling*. Berlin: Springer–Verlag.
- Goodwin, E. T. (1949). The evaluation of integrals of the form. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 45(02), 241. doi:10.1017/s0305004100024786.
- Grinder-Pedersen, L., Bukhave, K., Jensen, M., Højgaard, L., & Hansen, M. (2004). Calcium from milk or calcium-fortified foods does not inhibit nonheme-iron absorption from a whole diet consumed over a 4-d period. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(2), 404–409. doi:10.1093/ajcn/80.2.404.
- Gruenheid, S., Cellier, M., Vidal, S., & Gros, P. (1995). Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics*, 25(2), 514–525. doi:10.1016/0888-7543(95)80053-o.
- Guéguen, L., Pointillart, A. (2000). The Bioavailability of Dietary Calcium. *J Am Coll Nutr*: 19(sup2), 119S–136S. doi:10.1080/07315724.2000.10718083.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L., Hediger, M. A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388(6641), 482–488. doi:10.1038/41343.
- Gunshin, H., Allerson, C. R., Polycarpou-Schwarz, M., Rofts, A., Rogers, J. T., Kishi, F., Hentze, M.W., Rouault, T.A., Andrews, N.C. & Hediger, M.A. (2001). Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett*, 509(2), 309–316. doi: 10.1016/s0014-5793(01)03189-1.
- Gunshin, H., Fujiwara, Y., Custodio, A. O., Drenzo, C., Robine, S., & Andrews, N. C. (2005). Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J. Clin. Invest*, 115(5), 1258–1266. doi: 10.1172/JCI24356.
- Guo, B., Phillips, J. D., Yu, Y., & Leibold, E. A. (1995). Iron Regulates the Intracellular Degradation of Iron Regulatory Protein 2 by the Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21645–21651. doi:10.1074/jbc.270.37.21645.

- Guo, B., Yuan Y. (2017). A comparative review of methods for comparing means using partially paired data. *Stat Methods Med Res*: 26(3), 1323-1340. doi: 10.1177/0962280215577111.
- Gupta, V., Doshi, N., & Mitragotri, S. (2013). Permeation of insulin, calcitonin and exenatide across Caco-2 monolayers: measurement using a rapid, 3-day system. *PLoS One*, 8(2):e57136. doi: 10.1371/journal.pone.0057136. PMID: 23483881; PMCID: PMC3586668.
- Gyorgyi, L., Turanyi, T., & Field, R. J. (1990). Mechanistic details of the oscillatory Belousov-Zhabotinskii reaction. *The Journal of Physical Chemistry*, 94(18), 7162–7170. doi:10.1021/j100381a039.
- Hall, D. R., Hadden, J. M., Leonard, G. A., Bailey, S., Neu, M., Winn, M., & Lindley, P. F. (2001). The crystal and molecular structures of diferric porcine and rabbit serum transferrins at resolutions of 2.15 and 2.60 Å, respectively. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 58(1), 70–80. doi:10.1107/s0907444901017309.
- Hallberg, L., Björn-Rasmussen, E., Howard, L., & Rossander, L. (1979). Dietary Heme Iron Absorption. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 14(7), 769–779. doi:10.3109/00365527909181403.
- Hallberg, L., Brune, M., & Rossander, L. (1989). Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 49(1), 140–144. doi:10.1093/ajcn/49.1.140.
- Hallberg, L., Brune, M., Erlandsson, M., Sandberg, A. S., & Rossander-Hultén, L. (1991). Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(1), 112–119. doi:10.1093/ajcn/53.1.112.
- Hallberg, L., Rossander-Hultén, L., Brune, M., Glerup, A. (1992). Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46(5), 317–327.
- Hallberg, L., Rossander-Hultén, L., Brune, M., & Glerup, A. (1993). Inhibition of haem-iron absorption in man by calcium. *British Journal of Nutrition*, 69(02), 533–540. doi:10.1079/bjn19930053.
- Han, O., Failla, M. L., Hill, A. D., Morris, E. R., & Smith, J. C. (1995). Reduction of Fe(III) is required for uptake of non heme iron by Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, 125(5), 1291–1299. doi: 10.1093/jn/125.5.1291.
- Harris, S. S. (2002). The Effect of Calcium Consumption on Iron Absorption and Iron Status. *Nutrition in Clinical Care*, 5(5), 231–235. doi:10.1046/j.1523-5408.2002.05505.x.
- Harrison, P. M., & Arosio, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1275(3), 161–203. doi:10.1016/0005-2728(96)00022-9.
- Hasty, J., Dolnik, M., Rottschäfer, V., & Collins, J. J. (2002). Synthetic Gene Network for Entraining and Amplifying Cellular Oscillations. *Physical Review Letters*, 88(14). doi:10.1103/physrevlett.88.148101.
- He, W., Feng, Y., Li, X., Wei, Y., & Yang, X. (2008). Availability and toxicity of Fe(II) and Fe(III) in Caco-2 cells. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 9(9), 707–712. doi:10.1631/jzus.b0820023.

- Heaney, R. P. (2015). Calcium. En: Coates, P. M., Betz, J. M., Blackman, M. R., Cragg, G. M., Levine, M., Moss, J. & White, J. D. (Eds.), *Encyclopedia of Dietary Supplements*. (2da ed., pp. 101–106). London and New York: Informa Healthcare.
- Heaney, M. M., & Andrews, N. C. (2004). Iron homeostasis and inherited iron overload disorders: an overview. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 18(6), 1379–1403. doi:10.1016/j.hoc.2004.06.018.
- Heikal, A. A., Hess, S. T., & Webb, W. W. (2001). Multiphoton molecular spectroscopy and excited-state dynamics of enhanced green fluorescent protein (EGFP): acid–base specificity. *Chemical Physics*, 274(1), 37–55. doi:10.1016/s0301-0104(01)00486-4.
- Hennigar, S. R., Gaffney-Stomberg, E., Lutz, L. J., Cable, S. J., Pasiakos, S. M., Young, A. J., & McClung, J. P. (2016). Consumption of a calcium and vitamin D-fortified food product does not affect iron status during initial military training: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *British Journal of Nutrition*, 115(04), 637–643. doi:10.1017/s0007114515004766.
- Herrera M, J., Parra S, B. E., Corrales A, V., Olivares G, M., Pizarro A, F., & Gaitán Ch, D. (2015). Calcium as a nutrient involved in the synthesis and localization of proteins that facilitate iron uptake and efflux in enterocytes. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(4), 392–398. doi:10.4067/s0717-75182015000400011.
- Hess, S. T., Sheets, E. D., Wagenknecht-Wiesner, A., & Heikal, A. A. (2003). Quantitative Analysis of the Fluorescence Properties of Intrinsically Fluorescent Proteins in Living Cells. *Biophysical Journal*, 85(4), 2566–2580. doi:10.1016/s0006-3495(03)74679-7.
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J., & Borchardt, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96(3), 736–749. doi:10.1016/0016-5085(89)90897-4.
- Hilgemann, D.W., Collins, A. & Matsuoka, S. (1992). Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. *The Journal of general physiology*, 100(6): 933–961.
- Hill, T. (1977). *Free energy transduction in biology: the steady-state kinetic and thermodynamic formalism*. New York: Academic Press.
- Hirayama, S., Yasuda, H., Okamoto, M., & Tanaka, F. (1991). Effect of pressure on the natural radiative lifetimes of anthracene derivatives in solution. *The Journal of Physical Chemistry*, 95(8), 2971–2975. doi:10.1021/j100161a008.
- Hofer, T., Marzetti, E., Seo, A.Y., Xu, J., Knutson, M.D., & Leeuwenburgh, C. (2008). Mechanisms of iron regulation and oxidative stress in sarcopenia and neurodegenerative diseases. In book: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Publisher: Research Signpost, Editors: Carlos Gutiérrez-Merino and Christiaan Leeuwenburgh.
- Hong, X., Meng, Y., Kalkanis, S.N. (2016). Serum proteins are extracted along with monolayer cells in plasticware and interfere with protein analysis. *J Biol Methods.*, 3(4):e51. doi: 10.14440/jbm.2016.129. PMID: 27631018; PMCID: PMC5019348.
- Hou, J. C., & Pessin, J. E. (2007). Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUT4 trafficking. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(4), 466–473. doi:10.1016/j.ceb.2007.04.018. PMID: 17644329; PMCID: PMC2041936.
- Hu, R., Cao, Q., Sun, Z., Chen, J., Zheng, Q., & Xiao, F. (2017). A novel method of neural differentiation of PC12 cells by using Opti-MEM as a basic induction medium. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(1):195-201. doi:10.3892/ijmm.2017.3195. PMID: 29115371; PMCID: PMC5746309.

- Huang, X. (2003). Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1-2), 153–171. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.08.023.
- Huang, Q.-D., Ren, J., Ou, W.-J., Fu, Y., Cai, M.-Q., Zhang, J., Zhu, W., Yu, X.-Q. (2012). Cationic Lipids Containing Cyclen and Ammonium Moieties as Gene Delivery Vectors. *Chemical Biology & Drug Design*, 79(6), 879–887. doi:10.1111/j.1747-0285.2012.01355.x. PMID: 22321835.
- Hubert, N., & Hentze, M.W. (2002). Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: Implications for regulation and cellular function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 12345–12350. doi:10.1073/pnas.192423399.
- Huebers, E., Nelson, N.J., Huebers, H.A., & Rasey, J.S. (1987). Removal of transferrin from fetal bovine serum. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 110(6), 719–25.
- Hunt, J. R., Gallagher, S. K., & Johnson, L. K. (1994). Effect of ascorbic acid on apparent iron absorption by women with low iron stores. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(6), 1381–1385. doi:10.1093/ajcn/59.6.1381.
- Hunt, J. R. (2002). Moving toward a Plant-based Diet: Are Iron and Zinc at Risk? *Nutrition Reviews*, 60(5), 127–134. doi:10.1301/00296640260093788.
- Hurrell, R. F., Lynch, S. R., Trinidad, T. P., Dassenko, S. A., & Cook, J. D. (1989). Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 49(3), 546–552. doi:10.1093/ajcn/49.3.546.
- Hurrell, R. F., Juillerat, M. A., Reddy, M. B., Lynch, S. R., Dassenko, S. A., & Cook, J. D. (1992). Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 56(3), 573–578. doi:10.1093/ajcn/56.3.573.
- Hurrell, R. F., Reddy, M., Cook, J. D. (1999). Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Br J Nutr*, 81(4), 289–295. doi:10.1017/s0007114599000537.
- Hurrell, R. F. (2002). Fortification: Overcoming Technical and Practical Barriers. *The Journal of Nutrition*, 132(4), 806S–812S. doi:10.1093/jn/132.4.806s. PMID: 11925486.
- Hurrell. (2004). Phytic Acid Degradation as a Means of Improving Iron Absorption. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 74(6), 445–452. doi:10.1024/0300-9831.74.6.445.
- Hurrell, R. F., Reddy, M. B., Juillerat, M., & Cook, J. D. (2006). Meat Protein Fractions Enhance Nonheme Iron Absorption in Humans. *The Journal of Nutrition*, 136(11), 2808–2812. doi:10.1093/jn/136.11.2808.
- Hurrell, R., & Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1461S–1467S. doi:10.3945/ajcn.2010.28674f.
- Iacopetta, B. J., & Morgan, E. H. (1983). The kinetics of transferrin endocytosis and iron uptake from transferrin in rabbit reticulocytes, *J. Biol. Chem*, 258, 9108–9115.
- Ilbert, M., & Bonnefoy, V. (2013). Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(2), 161–175. doi:10.1016/j.bbabi.2012.10.001.
- Illing, A. C., Shawki, A., Cunningham, C.L., Mackenzie, B. (2012). Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1. *J. Biol. Chem*, 287(36), 30485–30496. doi: 10.1074/jbc.M112.364208.

- Institute of Medicine. (2001). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington (DC): The National Academies Press. doi: 10.17226/10026.
- Institute of Medicine. (2011). Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: The National Academies Press, 2011. doi.org/10.17226/13050.
- Ireland, P. & Fordtran, J. S. (1973). Effect of dietary calcium and age on jejunal calcium absorption in humans studied by intestinal perfusion. *Journal of Clinical Investigation*, 52(11):2672-2681. doi: 10.1172/JCI107461.
- Ivanovic, R. F., Viana, N. I., Morais, D. R., Silva, I. A., Leite, K. R., Pontes-Junior, J., Inoue, G., Nahas, W. C., Srougi, M., Reis, S. T. (2018). miR-29b enhances prostate cancer cell invasion independently of MMP-2 expression. *Cancer Cell International*, 18(1). doi:10.1186/s12935-018-0516-0. PMID: 29440967; PMCID: PMC5800054.
- Jaramillo, Á., Briones, L., Andrews, M., Arredondo, M., Olivares, M., Brito, A., & Pizarro, F. (2015). Effect of phytic acid, tannic acid and pectin on fasting iron bioavailability both in the presence and absence of calcium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 30, 112–117. doi:10.1016/j.jtemb.2014.11.005.
- Jia, L, Nie XQ, Ji HM, Yuan ZX, Li RS. (2021). Multiple-Coated PLGA Nanoparticles Loading Triptolide Attenuate Injury of a Cellular Model of Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int*: 8825640. doi: 10.1155/2021/8825640.
- Johnson, J. M., Walker, P. M. (1992). Zinc and iron utilization in young women consuming a beef-based diet. *J Am Diet Assoc*, 92(12), 1474-1478.
- Johnson, J. A. & Kumar, R. (1994). Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D-dependent calcium binding proteins. *Seminars in Nephrology*, 14(2):119-28. PMID: 8177979.
- Johnson, D. M., Yamaji, S., Tennant, J., Srail, S. K., & Sharp, P. A. (2005). Regulation of divalent metal transporter expression in human intestinal epithelial cells following exposure to non-haem iron. *FEBS Letters*, 579(9), 1923–1929. doi:10.1016/j.febslet.2005.02.035.
- Johnston, K. L., Johnson, D. M., Marks, J., Srail, S. K., Debnam, E. S., & Sharp, P. A. (2006). Non-haem iron transport in the rat proximal colon. *European Journal of Clinical Investigation*, 36(1), 35–40. doi:10.1111/j.1365-2362.2006.01585.x.
- Joyce, N. C., Haire, M. F., & Palade, G. E. (1987). Morphologic and biochemical evidence for a contractile cell network within the rat intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 92(1), 68–81. doi:10.1016/0016-5085(87)90841-9.
- Kabanov, A. V., & Kabanov, V. A. (1995). DNA Complexes with Polycations for the Delivery of Genetic Material into Cells. *Bioconjugate Chemistry*, 6(1), 7–20. doi:10.1021/bc00031a002. PMID: 7711106.
- Kakhlon, O., & Cabantchik, Z. I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. This article is part of a series of reviews on “Iron and Cellular Redox Status.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(8), 1037–1046. doi:10.1016/s0891-5849(02)01006-7.
- Kalambet, Y., Kozmin, Y., & Samokhin, A. (2018). Comparison of integration rules in the case of very narrow chromatographic peaks. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 179, 22–30. doi:10.1016/j.chemolab.2018.06.001.

- Kalgaonkar, S., & Lönnerdal, B. (2008). Effects of dietary factors on iron uptake from ferritin by Caco-2 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(1), 33–39. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.02.001.
- Kawabata, H., Yang, R., Hiramata, T., Vuong, P. T., Kawano, S., Gombart, A. F., & Koeffler, H. P. (1999). Molecular Cloning of Transferrin Receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(30), 20826–20832. doi:10.1074/jbc.274.30.20826.
- Kawabata, H. (2018). Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radical Biology and Medicine*. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.
- Kelleher, S. L., Chatterton, D., Nielsen, K., & Lönnerdal, B. (2003). Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(5), 1261–1268. doi:10.1093/ajcn/77.5.1261.
- Khammanit, R., Chantakru, S., Kitiyanant, Y., & Saikhun, J. (2008). Effect of serum starvation and chemical inhibitors on cell cycle synchronization of canine dermal fibroblasts. *Theriogenology*, 70(1), 27–34. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.02.015. PMID: 18423836.
- Khanal, R. C., & Nemere, I. (2008). Regulation of Intestinal Calcium Transport. *Annual Review of Nutrition*, 28(1), 179–196. doi:10.1146/annurev.nutr.010308.161202.
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173–3178. doi:10.1007/s00216-010-3821-6. PMID: 20549496; PMCID: PMC2911531.
- Knovich, M. A., Storey, J. A., Coffman, L. G., Torti, S. V., & Torti, F. M. (2009). Ferritin for the clinician. *Blood Reviews*, 23(3), 95–104. doi:10.1016/j.blre.2008.08.001.
- Knuth, D.E. (1997). *The art of computer programming. Vol. 2: Seminumerical Algorithms*. 3rd ed. Boston: Addison-Wesley.
- Kochanowski, B. A., & McMahan, C. L. (1990). Inhibition of iron absorption by calcium in rats and dogs: Effects of mineral separation by time and enteric coating. *Nutrition Research*, 10(2), 219–226. doi:10.1016/s0271-5317(05)80609-8.
- Krause, A., Neitz, S., Mägert, 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 Letters*, 480(2-3), 147–150. doi:10.1016/s0014-5793(00)01920-7.
- Krishnamurthy, P., Xie, T., & Schuetz, J. (2007). The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacology & Therapeutics*, 114(3), 345–358. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.02.001.
- Kruszewski, M. (2003). Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1-2), 81–92. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.08.004.
- Kuiper, C., & Vissers, M. C. M. (2014). Ascorbate as a Co-Factor for Fe- and 2-Oxoglutarate Dependent Dioxygenases: Physiological Activity in Tumor Growth and Progression. *Frontiers in Oncology*, 4. doi:10.3389/fonc.2014.00359.
- Kutuzova, G. D., & DeLuca, H. F. (2004). Gene expression profiles in rat intestine identify pathways for 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulated calcium absorption and clarify its immunomodulatory properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 432(2), 152–166. doi:10.1016/j.abb.2004.09.004.
- Labat-Moleur, F., Steffan, A.M., Brisson, C., Perron, H., Feugeas, O., Furstenberger, P., Oberling, F., Brambilla, E., Behr, J.P. (1996). An electron microscopy study into the

- mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther.*, 3(11):1010-7. PMID: 9044741.
- Laftah, A. H., Latunde-Dada, G. O., Fakih, S., Hider, R. C., Simpson, R. J., & McKie, A. T. (2008). Haem and folate transport by proton-coupled folate transporter/haem carrier protein 1 (SLC46A1). *British Journal of Nutrition*, 101(08), 1150. doi:10.1017/s0007114508066762.
- Lagarias, J. C., Reeds, J. A., Wright, M. H., & Wright, P. E. (1998). Convergence Properties of the Nelder--Mead Simplex Method in Low Dimensions. *SIAM Journal on Optimization*, 9(1), 112–147. doi:10.1137/s1052623496303470.
- Laine, R., Stuckey, D. W., Manning, H., Warren, S. C., Kennedy, G., Carling, D., Dunsby, C., Sardini, A., French, P. M. W. (2012). Fluorescence Lifetime Readouts of Troponin-C-Based Calcium FRET Sensors: A Quantitative Comparison of CFP and mTFP1 as Donor Fluorophores. *PLoS ONE*, 7(11), e49200. doi:10.1371/journal.pone.0049200. PMID: 23152874; PMCID: PMC3494685.
- Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, (2da ed). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 130–131.
- Lam-Yuk-Tseung, S., Govoni, G., Forbes, J., Gros, P. (2003). Iron transport by Nramp2/DMT1: pH regulation of transport by 2 histidines in transmembrane domain 6. *Blood*, 101(9), 3699–3707. doi:10.1182/blood-2002-07-2108.
- Lampert, R. A., Meech, S. R., Metcalfe, J., Phillips, D., & Schaap, A. P. (1983). The refractive index correction to the radiative rate constant in fluorescence lifetime measurements. *Chemical Physics Letters*, 94(2), 137–140. doi:10.1016/0009-2614(83)87560-5.
- Lane, D. J. R., Chikhani, S., Richardson, V., & Richardson, D. R. (2013). Transferrin iron uptake is stimulated by ascorbate via an intracellular reductive mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(6), 1527–1541. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.02.010.
- Lao, B. J., & Kamei, D. T. (2006). A compartmental model of iron regulation in the mouse. *Journal of Theoretical Biology*, 243(4), 542–554. doi:10.1016/j.jtbi.2006.06.033.
- Latunde-Dada, G. O., Simpson, R. J., & McKie, A. T. (2008). Duodenal Cytochrome B Expression Stimulates Iron Uptake by Human Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Nutrition*, 138(6), 991–995. doi:10.1093/jn/138.6.991.
- LaVaute, T., Smith, S., Cooperman, S., Iwai, K., Land, W., Meyron-Holtz, E., Drake, S. K., Miller, G., Abu-Asab, M., Tsokos, M., Switzer, R. 3rd, Grinberg, A., Love, P., Tresser, N., & Rouault, T. A. (2001). Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2 causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice. *Nat Gene*, 27(2), 209-214. doi: 10.1038/84859.
- Lawrence, C. M. (1999). Crystal Structure of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor. *Science*, 286(5440), 779–782. doi:10.1126/science.286.5440.779.
- Layrisse, M., García-Casal, M. N., Solano, L., Baron, M. A., Arguello, F., Llovera, D., Ramírez, J., Leets, I., & Tropper, E. (1997). The role of vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption: Preliminary results. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 8(2), 61–67. doi:10.1016/s0955-2863(96)00174-x.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R. & Pugin A. (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana glauca* cells. *Plant Cell*, 14(10), 2627-2641. doi: 10.1105/tpc.005579. PMID: 12368509; PMCID: PMC151240.

- Lee, P. L., Gelbart, T., West, C., Halloran, C., & Beutler, E. (1998). The Human Nramp2 Gene: Characterization of the Gene Structure, Alternative Splicing, Promoter Region and Polymorphisms. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 24(2), 199–215. doi:10.1006/bcmd.1998.0186.
- Lee, K. C. B., Siegel, J., Webb, S. E. D., Lévêque-Fort, S., Cole, M. J., Jones, R., Dowling, K., Lever, M. J., & French, P. M. W. (2001). Application of the Stretched Exponential Function to Fluorescence Lifetime Imaging. *Biophysical Journal*, 81(3), 1265–1274. doi:10.1016/s0006-3495(01)75784-0.
- Li, X. Q., Tembe, V., Horwitz, G. M., Bushinsky, D. A., Favus, M. J. (1993). Increased intestinal vitamin D receptor in genetic hypercalciuric rats. A cause of intestinal calcium hyperabsorption. *Journal of Clinical Investigation*, 91(2):661-7. doi: 10.1172/JCI116246.
- Li, T., Braunstein, K. E., Zhang, J., Lau, A., Sibener, L., Deeble, C., & Wong, P. C. (2016). The neuritic plaque facilitates pathological conversion of tau in an Alzheimer's disease mouse model. *Nature Communications*, 7, 12082. doi:10.1038/ncomms12082.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M. A., Webert, H., Wilbrecht, C., Mühlenhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1491–1508. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.009.
- Limdi, J. K., & Crampton, J. R. (2004). Hereditary haemochromatosis. *QJM*, 97(6), 315–324. doi:10.1093/qjmed/hch065.
- Linder, M. C., Moriya, M., Whon, A., Kassa, A., & Gilley, C. (2006). Vesicular transport of Fe and interaction with other metal ions in polarized Caco2 Cell monolayers. *Biological Research*, 39(1). doi:10.4067/s0716-97602006000100016.
- Liu, C., Liang, M.C., Soong, T.W. (2019). Nitric Oxide, Iron and Neurodegeneration. *Front Neurosci*: 18, 13-114, 2019. doi: 10.3389/fnins.2019.00114.
- Lönnerdal, B. (2010). Calcium and Iron Absorption - Mechanisms and Public Health Relevance. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 80(45), 293–299. doi:10.1024/0300-9831/a000036.
- López, M. A. A., & Martos, F. C. (2004). Iron availability: An updated review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(8), 597–606. doi:10.1080/09637480500085820.
- Lufino, M. M., Edser, P. A., & Wade-Martins, R. (2008). Advances in High-capacity Extrachromosomal Vector Technology: Episomal Maintenance, Vector Delivery, and Transgene Expression. *Molecular Therapy*, 16(9), 1525–1538. doi:10.1038/mt.2008.156. PMID: 18628754.
- Luke, B., Minogue, J., Witter, F. R., Keith, L. G., & Johnson, T. R. B. (1993). The ideal twin pregnancy: Patterns of weight gain, discordancy, and length of gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 169(3), 588–597. doi:10.1016/0002-9378(93)90628-v.
- Lymboussaki, A., Pignatti, E., Montosi, G., Garuti, C., Haile, D. J., & Pietrangelo, A. (2003). The role of the iron responsive element in the control of ferroportin1/IREG1/MTP1 gene expression. *J Hepatol*, 39(5), 710–715. doi:10.1016/s0168-8278(03)00408-2.

- Lynch, S. R., Dassenko, S. A., Cook, J. D., Juillerat, M. A., & Hurrell, R. F. (1994). Inhibitory effect of a soybean-protein-related moiety on iron absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 60(4), 567–572. doi:10.1093/ajcn/60.4.567.
- Ma, T. Y., Tran, D., Hoa, N., Nguyen, D., Merryfield, M., & Tarnawski, A. (2000). Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: Role of cytoskeletal involvement. *Microscopy Research and Technique*, 51(2), 156–168. doi:10.1002/1097-0029(20001015)51:2<156::aid-jemt7>3.0.co;2-j.
- Ma, Y., Specian, R. D., Yeh, K.-Y., Yeh, M., Rodriguez-Paris, J., & Glass, J. (2002). The transcytosis of divalent metal transporter 1 and apo-transferrin during iron uptake in intestinal epithelium. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283(4), G965–G974. doi:10.1152/ajpgi.00005.2002.
- Ma, J., Chen, J.-Y., Guo, J., Wang, C. C., Yang, W. L., Xu, L., & Wang, P. N. (2006). Photostability of thiol-capped CdTe quantum dots in living cells: the effect of photo-oxidation. *Nanotechnology*, 17(9), 2083–2089. doi:10.1088/0957-4484/17/9/002.
- Ma, Y., Yeh, M., Yeh, K., & Glass, J. (2006b). Iron Imports. V. Transport of iron through the intestinal epithelium. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(3), G417–G422. doi:10.1152/ajpgi.00489.2005.
- Ma, J., Yeh, M., Yeh, K., Glass, J. (2018). A fluorescent metal-sensor study provides evidence for iron transport by transcytosis in the intestinal epithelial cells. *J Clin Biochem Nutr*, 62(1), 49-55. doi: 10.3164/jcbrn.17-74.
- Macedo, M., & Sousa, M. (2008). Transferrin and the Transferrin Receptor: Of Magic Bullets and Other Concerns. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*, 7(1), 41–52. doi:10.2174/187152808784165162.
- Mackenzie, B., Ujwal, M. L., Chang, M.-H., Romero, M. F., & Hediger, M. A. (2005). Divalent metal-ion transporter DMT1 mediates both H⁺-coupled Fe²⁺ transport and uncoupled fluxes. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 451(4), 544–558. doi:10.1007/s00424-005-1494-3.
- Mackenzie, B., Takanaga, H., Hubert, N., Rolfs, A., & Hediger, M. A. (2007). Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochemical Journal*, 403(1), 59–69. doi:10.1042/bj20061290.
- Mahan, D. C., Ching, S., & Dabrowski, K. (2004). Developmental aspects and factors influencing the synthesis and status of ascorbic acid in the pig. *Annual Review of Nutrition*, 24(1), 79–103. doi:10.1146/annurev.nutr.24.012003.132150.
- Maloney, J.A., Tsygankova, O.M., Yang, L., Li Q., Szot, A., Baysal, K., Williamson, J.R. (1999). Activation of ERK by Ca²⁺ store depletion in rat liver epithelial cells. *Am J Physiol*: 276(1), C221-C230. doi: 10.1152/ajpcell.1999.276.1.C221.
- Manatschal, C., Pujol-Giménez, J., Poirier, M., Reymond, J.L., Hediger, M.A., Dutzler, R. (2019). Mechanistic basis of the inhibition of SLC11/NRAMP-mediated metal ion transport by bis-isothiourea substituted compounds. *Elife*: 8:e51913. doi: 10.7554/eLife.51913.
- Mandl, J., Szarka, A., & Bánhegyi, G. (2009). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 157(7), 1097–1110. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00282.x.
- Mann J., & Truswell S. (2012). *Essentials of Human Nutrition*. 4th ed. Oxford University Press; Oxford, UK.

- Marcu, L., Grundfest, W. S., & Maarek, J.-M. I. (1999). Photobleaching of Arterial Fluorescent Compounds: Characterization of Elastin, Collagen and Cholesterol Time-resolved Spectra during Prolonged Ultraviolet Irradiation. *Photochemistry and Photobiology*, 69(6), 713–721. doi:10.1111/j.1751-1097.1999.tb03352.x.
- Markowski, C. A., & Markowski, E. P. (1990). Conditions for the Effectiveness of a Preliminary Test of Variance. *The American Statistician*, 44(4), 322. doi:10.2307/2684360.
- Martínez, D.R., Blanco, V., Boullón, M., Cabaleiro, J., Pena, T. (2007). Analytical performance models of parallel programs in clusters. *Parallel Computing: Architectures, Algorithms and Applications*, 15, 99-106.
- Martínez, D., Albín, J., Cabaleiro, J., Pena, T., Rivera, F., Blanco, V. (2009). El Criterio de Información de Akaike en la Obtención de Modelos Estadísticos de Rendimiento. Conference: XX Jornadas de Paralelismo, 439-444.
- Mastrogiannaki, M., Matak, P., Keith, B., Simon, M. C., Vaulont, S., and Peyssonnaud, C. (2009). HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 1159–1166. doi: 10.1172/JCI38499.
- MATLAB User's Guide. Natick, MA: The Mathworks, Inc.; 1998.
- Menter, J. M., Williamson, G. D., Carlyle, K., Moore, C. L., & Willis, I. (1995). Photochemistry of type I acid-soluble calf skin collagen: dependence on excitation wavelength. *Photochemistry and Photobiology*, 62(3), 402–408. doi:10.1111/j.1751-1097.1995.tb02360.x. PMID: 8570699.
- McElreath, R. (2016). *Statistical Rethinking: A Bayesian Course with Examples in R and Stan* (1st ed). New York: Chapman and Hall/CRC. doi: 10.1201/9781315372495.
- McKie, A. T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T. J., Farzaneh, F., Hediger, M. A., Hentze, M. W. & Simpson, R. J. (2000). A Novel Duodenal Iron-Regulated Transporter, IREG1, Implicated in the Basolateral Transfer of Iron to the Circulation. *Molecular Cell*, 5(2), 299–309. doi:10.1016/s1097-2765(00)80425-6.
- Mendoza, C., Peerson, J. M., Brown, K. H., & Lönnerdal, B. (2004). Effect of a micronutrient fortificant mixture and 2 amounts of calcium on iron and zinc absorption from a processed food supplement. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(2), 244–250. doi:10.1093/ajcn/79.2.244.
- Messori, L., & Kratz, F. (1994). Transferrin: From Inorganic Biochemistry to Medicine. *Metal-Based Drugs*, 1(2-3), 161–167. doi:10.1155/mbd.1994.161.
- Meyron-Holtz, E. G., Ghosh, M. C., Iwai, K., LaVaute, T., Brazzolotto, X., Berger, U. V., Land, W., Ollivierre-Wilson, H., Grinberg, A., Love, P., Rouault, T.A. (2004). Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J*, 23(2), 386–395. doi: 10.1038/sj.emboj.7600041.
- Miles, F., Lynch, J., & Sikes, R. (2015). Cell-based assays using calcein acetoxymethyl ester show variation in fluorescence with treatment conditions. *J Biol Methods*, 2(3):e29. doi: 10.14440/jbm.2015.73.
- Milo, R. & Phillips, R. (2015) *Cell biology by the numbers*. (1ra ed.). New York: Garland Science.
- Mims, M. P., & Prchal, J. T. (2005). Divalent metal transporter 1. *Hematology*, 10(4), 339–345. doi:10.1080/10245330500093419.

- Mingzhu, S., Yingchen, L. & Wei, Y. (2021). A Dynamic Model of Cytosolic Calcium Concentration Oscillations in Mast Cells. *Mathematics*, 9, 2322. doi:10.3390/math9182322.
- Minihane, A. M., & Fairweather-Tait, S. J. (1998). Effect of calcium supplementation on daily nonheme-iron absorption and long-term iron status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68(1), 96–102. doi:10.1093/ajcn/68.1.96.
- Mirska, D., Schirmer, K., Funari, S. S., Langner, A., Dobner, B., & Brezesinski, G. (2005). Biophysical and biochemical properties of a binary lipid mixture for DNA transfection. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40(1), 51–59. doi:10.1016/j.colsurfb.2004.10.007. PMID: 15620840.
- Miyazaki, E., Kato, J., Kobune, M., Okumura, K., Sasaki, K., Shintani, N., Arosio, P., & Niitsu, Y. (2002). Denatured H-ferritin subunit is a major constituent of haemosiderin in the liver of patients with iron overload. *Gut*, 50(3), 413–419. doi:10.1136/gut.50.3.413.
- Mølgaard, C., Kæstel, P., & Michaelsen, K. F. (2005). Long-term calcium supplementation does not affect the iron status of 12–14-y-old girls. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(1), 98–102. doi:10.1093/ajcn/82.1.98.
- Monsen, E. R., & Cook, J. D. (1976). Food iron absorption in human subjects IV. The effects of calcium and phosphate salts on the absorption of nonheme iron. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 29(10), 1142–1148. doi:10.1093/ajcn/29.10.1142.
- Montalbetti, N., Simonin, A., Kovacs, G., & Hediger, M. A. (2013). Mammalian iron transporters: Families SLC11 and SLC40. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), 270–287. doi:10.1016/j.mam.2013.01.002.
- Montalbetti, N., Simonin, A., Simonin, C., Awale, M., Reymond, J.L., Hediger, M.A. (2015). Discovery and characterization of a novel non-competitive inhibitor of the divalent metal transporter DMT1/SLC11A2. *Biochem Pharmacol*: 96(3), 216-224. doi: 10.1016/j.bcp.2015.05.002.
- Moretti, D., Zimmermann, M. B., Muthayya, S., Thankachan, P., Lee, T.-C., Kurpad, A. V., & Hurrell, R. F. (2006). Extruded rice fortified with micronized ground ferric pyrophosphate reduces iron deficiency in Indian schoolchildren: a double-blind randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(4), 822–829. doi:10.1093/ajcn/84.4.822.
- Morgan, E. H. (1981). Transferrin, biochemistry, physiology and clinical significance. *Molecular Aspects of Medicine*, 4(1), 1–123. doi:10.1016/0098-2997(81)90003-0.
- Morris, E. R. (1983). An overview of current information on bioavailability of dietary iron to humans. *Fed Proc*, 42, 1716-1720.
- Moslemi, M., Hosseini, H., Neyestani, T. R., Akramzadeh, N., & Mazaheri Nezhad Fard, R. (2018). Effects of non-digestive polymers used in iron encapsulation on calcium and iron apparent absorption in rats fed by infant formula. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50, 393–398. doi:10.1016/j.jtemb.2018.08.004.
- Mostov, K., Su, T., & ter Beest, M. (2003). Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nature Cell Biology*, 5(4), 287–293. doi:10.1038/ncb0403-287.
- Muñoz, M., Villar, I., & García-Erce, J. A. (2009). An update on iron physiology. *World Journal of Gastroenterology*, 15(37), 4617. doi:10.3748/wjg.15.4617.
- Nakano, T., Watanabe, H., Ozeki, M., Asai, M., Katoh, H., Satoh, H., Hayashi, H. (2006). Endoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion induces endothelial cell apoptosis

- independently of caspase-12. *Cardiovasc Res*: 69(4), 908-915, 2006. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.11.023.
- Nanni, L., Lumini, A. Genetic programming for creating Chou's pseudo amino acid based features for submitochondria localization. *Amino Acids*: 34(4), 653-660, 2008. doi: 10.1007/s00726-007-0018-1.
- Nathanson, M. H., McLaren, G. D., & Saidel, G. M. (1984). A model of intestinal iron absorption and plasma iron kinetics: Optimal parameter estimates for normal dogs. *Computers and Biomedical Research*, 17(1), 55–70. doi:10.1016/0010-4809(84)90006-5.
- Natoli, M., Leoni, B. D., D'Agnano, I., Zucco, F., & Felsani, A. (2012). Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicology in Vitro*, 26(8), 1243–1246. doi:10.1016/j.tiv.2012.03.009.
- Nemeth, E. (2002). Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, 101(7), 2461–2463. doi:10.1182/blood-2002-10-3235.
- Nguyen, V. M. M. (2010). *Mathematical Modeling and Simulation*. Mahidol University.
- Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J. L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A., & Vaulont, S. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*, 110(7), 1037-44. doi: 10.1172/JCI15686.
- Nicolas, G., Viatte, L., Lou, D.-Q., Bennoun, M., Beaumont, C., Kahn, A., Andrews, N., & Vaulont, S. (2003). Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nature Genetics*, 34(1), 97–101. doi:10.1038/ng1150.
- Nnah, I., & Wessling-Resnick, M. (2018). Brain Iron Homeostasis: A Focus on Microglial Iron. *Pharmaceuticals*, 11(4), 129. doi:10.3390/ph11040129.
- Novák, B., & Tyson, J. J. (2008). Design principles of biochemical oscillators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12), 981–991. doi:10.1038/nrm2530.
- Núñez, M. T., & Tapia, V. (1999). Transferrin stimulates iron absorption, exocytosis, and secretion in cultured intestinal cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 276(5), C1085–C1090. doi:10.1152/ajpcell.1999.276.5.c1085. PMID: 10329956.
- Núñez, M. T., Tapia, V., Toyokuni, S., & Okada, S. (2001). Iron-induced oxidative damage in colon carcinoma (caco-2) cells. *Free Radical Research*, 34(1), 57–68. doi:10.1080/10715760100300061.
- Núñez, M. T., Gallardo, V., Muñoz, P., Tapia, V., Esparza, A., Salazar, J., & Speisky, H. (2004). Progressive iron accumulation induces a biphasic change in the glutathione content of neuroblastoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(7), 953–960. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.005.
- Núñez, M. T., Tapia, V., Rojas, A., Aguirre, P., Gómez, F., & Nualart, F. (2010). Iron supply determines apical/basolateral membrane distribution of intestinal iron transporters DMT1 and ferroportin 1. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 298(3), C477–C485. doi:10.1152/ajpcell.00168.2009.
- Núñez, M. T. (2010). Regulatory mechanisms of intestinal iron absorption-Uncovering of a fast-response mechanism based on DMT1 and ferroportin endocytosis. *BioFactors*, NA–NA. doi:10.1002/biof.84.

- O'Brien, J. A., & Lummis, S. C. R. (2006). Biolistic transfection of neuronal cultures using a hand-held gene gun. *Nature Protocols*, 1(2), 977–981. doi:10.1038/nprot.2006.145. PMID: 17406333; PMCID: PMC2649370.
- Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A., & Fleming, M. D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*, 108(4), 1388–1394. doi:10.1182/blood-2006-02-003681.
- Olivares, M., Pizarro, F., Pineda, O., Name, J. J., Hertrampf, E., & Walter, T. (1997). Milk Inhibits and Ascorbic Acid Favors Ferrous Bis-Glycine Chelate Bioavailability in Humans. *The Journal of Nutrition*, 127(7), 1407–1411. doi:10.1093/jn/127.7.1407.
- Pacheco, F., Mejía, R., & Fernández, M. S. (1993). Calcium ions reverse a latency period induced by bovine serum albumin in the time course of phospholipase A2 action on 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes. *Biochemistry and Cell Biology*, 71(9-10), 462–466. doi:10.1139/o93-068. PMID: 8192898.
- Paecharoenchai, O., Niyomtham, N., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., Yingyongnarongkul, B., & Opanasopit, P. (2012). Structure Relationship of Cationic Lipids on Gene Transfection Mediated by Cationic Liposomes. *AAPS PharmSciTech*, 13(4), 1302–1308. doi:10.1208/s12249-012-9857-5. PMID: 23007192; PMCID: PMC3513429.
- Pan, Y., Ren, Z., Gao, S., Shen, J., Wang, L., Xu, Z., Yu, Y., Bachina, P., Zhang, H., Fan, X., Laganowsky, A., Yan, N. & Zhou, M. (2020). Structural basis of ion transport and inhibition in ferroportin. *Nat Commun*, 11(1):5686. doi: 10.1038/s41467-020-19458-6.
- Pantopoulos, K. (2004). Iron Metabolism and the IRE/IRP Regulatory System: An Update. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012(1), 1–13. doi:10.1196/annals.1306.001.
- Park, J., Eun, H.C., Kim, S., Roh, C., Park, S.J. (2019). Colorimetric Method for Detection of Hydrazine Decomposition in Chemical Decontamination Process. *Energies*: 12(20), 3967, 2019. doi:10.3390/en12203967.
- Peng, J.-B., Chen, X.-Z., Berger, U. V., Vassilev, P. M., Tsukaguchi, H., Brown, E. M., & Hediger, M. A. (1999). Molecular Cloning and Characterization of a Channel-like Transporter Mediating Intestinal Calcium Absorption. *Journal of Biological Chemistry*, 274(32), 22739–22746. doi:10.1074/jbc.274.32.22739.
- Pedraza, C. E., Chien, Y.-C., & McKee, M. D. (2008). Calcium oxalate crystals in fetal bovine serum: Implications for cell culture, phagocytosis and biomineralization studies in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(5), 1379–1393. doi:10.1002/jcb.21515.
- Pérez, A. V., Picotto, G., Carpentieri, A. R., Rivoira, M. A., Peralta López, M. E., & Tolosa de Talamoni, N. G. (2008). Minireview on Regulation of Intestinal Calcium Absorption. *Digestion*, 77(1), 22–34. doi:10.1159/000116623.
- Perfecto, A., Elgy, C., Valsami-Jones, E., Sharp, P., Hilty, F., & Fairweather-Tait, S. (2017). Mechanisms of Iron Uptake from Ferric Phosphate Nanoparticles in Human Intestinal Caco-2 Cells. *Nutrients*, 9(4), 359. doi:10.3390/nu9040359.
- Pfeifer, A., & Verma, I. M. (2001). Gene therapy: Promises and Problems. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2(1), 177–211. doi:10.1146/annurev.genom.2.1.177. PMID: 11701648.

- Phoaubon, S., Lertsuwan, K., Teerapornpuntakit, J., Charoenphandhu, N. (2021). Heparin induces intestinal calcium uptake while suppressing iron uptake in Caco-2 cells. *PLoS One*: 16(10), e0258433, 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0258433.
- Pisani, C., Rascol, E., Dorandeu, C., Gaillard, J.-C., Charnay, C., Guari, Y., Chopineau, J., Armengaud, J., Devoisselle, J.M., Prat, O. (2017). The species origin of the serum in the culture medium influences the in vitro toxicity of silica nanoparticles to HepG2 cells. *PLOS ONE*, 12(8), e0182906. doi:10.1371/journal.pone.0182906. PMID: 28796831; PMCID: PMC5552166.
- Piste, P., Sayaji, D., Avinash, M. (2013). Calcium and its Role in Human Body. *Int J Res Pharm Biomed Sci*: 4(2), 659-668.
- Popławska-Domaszewicz, K., Florczak-Wyspiańska, J., & Kozubski, W. (2014). Update on neurodegeneration with brain iron accumulation. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 48(3), 206–213. doi:10.1016/j.pjnns.2014.05.001.
- Preza, G. C., Ruchala, P., Pinon, R., Ramos, E., Quiao, B., Peralta, M. A., Sharma, S., Waring, A., Ganz, T., & Nemeth E. (2011). Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J Clin Invest*, 121(12), 4880–4888. doi:10.1172/JCI57693.
- Priddy, K., & Keller, P. (2005). *Artificial Neural Networks: An Introduction*. Washington: SPIE Press.
- Pu, F., Chen, N., & Xue, S. (2016). Calcium intake, calcium homeostasis and health. *Food Science and Human Wellness*, 5(1), 8–16. doi:10.1016/j.fshw.2016.01.001.
- Pujol-Giménez, J., Hediger, M. A., & Gyimesi, G. (2017). A novel proton transfer mechanism in the SLC11 family of divalent metal ion transporters. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-06446-y.
- Putney, J.W. Jr., Broad, L.M., Braun, F.J., Lievremont, J.P., Bird, G.S. (2001). Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci*: 114, 2223-2229, 2001. doi: 10.1242/jcs.114.12.2223.
- Priddy, K. & Keller, P. (2005). *Artificial Neural Networks: An Introduction*. Washington: SPIE Press.
- Qiao, B., Sugianto, P., Fung, E., del-Castillo-Rueda, A., Moran-Jimenez, M. J., Ganz, T., & Nemeth, E. (2012). Heparin-Induced Endocytosis of Ferroportin Is Dependent on Ferroportin Ubiquitination. *Cell Metabolism*, 15(6), 918–924. doi:10.1016/j.cmet.2012.03.018.
- Raffin, S. B., Woo, C. H., Roost, K. T., Price, D. C., & Schmid, R. (1974). Intestinal Absorption of Hemoglobin Iron-Heme Cleavage by Mucosal Heme Oxygenase. *J Clin Invest*, 54, 1344–1352. doi:10.1172/JCI107881.
- Ramajo, L., Marbà, N., Prado, L., Peron, S., Lardies, M. A., Rodriguez-Navarro, A. B., Vargas, C. A., Lagos, N. A., & Duarte, C. M. (2016). Biomineralization changes with food supply confer juvenile scallops (*Argopecten purpuratus*) resistance to ocean acidification. *Global Change Biology*, 22(6), 2025–2037. doi:10.1111/gcb.13179.
- Ramakrishnan, U., & Yip, R. (2002). Experiences and Challenges in Industrialized Countries: Control of Iron Deficiency in Industrialized Countries. *The Journal of Nutrition*, 132(4), 820S–824S. doi:10.1093/jn/132.4.820s.
- Rao, R. B., Fung, G., & Rosales, R. (2008). On the Dangers of Cross-Validation. An Experimental Evaluation. *Proceedings of the 2008 SIAM International Conference on Data Mining*, 588–596. doi:10.1137/1.9781611972788.54.

- Ravia, J. J., Stephen, R. M., Ghishan, F. K., & Collins, J. F. (2005). Menkes Copper ATPase (Atp7a) is a novel metal-responsive gene in rat duodenum, and immunoreactive protein is present on brush-border and basolateral membrane domains. *J Biol Chem*, 280(43), 36221-7. doi:10.1074/jbc.M506727200.
- Recillas-Targa, F. (2006). Multiple Strategies for Gene Transfer, Expression, Knockdown, and Chromatin Influence in Mammalian Cell Lines and Transgenic Animals. *Molecular Biotechnology*, 34(3), 337–354. doi:10.1385/mb:34:3:337. PMID: 17284781.
- Recker, R. R. (1985). Calcium Absorption and Achlorhydria. *New England Journal of Medicine*, 313(2), 70–73. doi:10.1056/nejm198507113130202.
- Rice, A. E., Mendez, M. J., Hokanson, C. A., Rees, D. C., & Björkman, P. J. (2009). Investigation of the Biophysical and Cell Biological Properties of Ferroportin, a Multi-Pass Integral Membrane Protein Iron Exporter. *J Mol Biol*, 386(3), 717–732. doi:10.1016/j.jmb.2008.12.063.
- Richardson, D. R., Lane, D. J. R., Becker, E. M., Huang, M. L. H., Whitnall, M., Rahmanto, Y. S., Sheftel, A. D., & Ponka, P. (2010). Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(24), 10775–10782. doi:10.1073/pnas.0912925107.
- Ríos, S. (1995). *Modelización*. Editorial: Alianza, Madrid. ISBN 10: 8420628220. ISBN 13: 9788420628226.
- Ríos-Castillo, I., Olivares, M., Brito, A., Romaña, D. L. de, & Pizarro, F. (2014). One-month of calcium supplementation does not affect iron bioavailability: A randomized controlled trial. *Nutrition*, 30(1), 44–48. doi:10.1016/j.nut.2013.06.007.
- Rivera, S. (2005). Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood*, 106(6), 2196–2199. doi:10.1182/blood-2005-04-1766.
- Robinson, D.J., de Bruijn, H.S., van der Veen, N., Stringer, M.R., Brown, S.B., Star, W.M. (1998). Fluorescence photobleaching of ALA-induced protoporphyrin IX during photodynamic therapy of normal hairless mouse skin: the effect of light dose and irradiance and the resulting biological effect. *Photochem Photobiol.*, 67(1):140-149. PMID: 9477772.
- Rochette, L., Gudjoncik, A., Guenancia, C., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2014). The iron-regulatory hormone hepcidin: A possible therapeutic target?. *Pharmacology & Therapeutics*. 146, 35–52. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.09.004.
- Rodríguez, J., & Mandalunis, P. M. (2018). A Review of Metal Exposure and Its Effects on Bone Health. *Journal of Toxicology*, 1–11. doi:10.1155/2018/4854152.
- Ronchetti, E., McQuarrie, A. D. R., & Tsai, C.-L. (2000). Regression and Time Series Model Selection. *Journal of the American Statistical Association*, 95(451), 1008. doi:10.2307/2669491.
- Rosado, J. L., Díaz, M., González, K., Griffin, I., Abrams, S. A., & Preciado, R. (2005). The Addition of Milk or Yogurt to a Plant-Based Diet Increases Zinc Bioavailability but Does Not Affect Iron Bioavailability in Women. *The Journal of Nutrition*, 135(3), 465–468. doi:10.1093/jn/135.3.465.
- Rouault, T.A. & Maio N. (2020). How Oxidation of a Unique Iron-Sulfur Cluster in FBXL5 Regulates IRP2 Levels and Promotes Regulation of Iron Metabolism Proteins. *Molecular Cell*, 78(1):1– 3. doi: 10.1016/j.molcel.2020.03.020.

- Roughead, Z. K. (Fariba), Zito, C. A., & Hunt, J. R. (2005). Inhibitory effects of dietary calcium on the initial uptake and subsequent retention of heme and nonheme iron in humans: comparisons using an intestinal lavage method. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(3), 589–597. doi:10.1093/ajcn.82.3.589.
- Rudy, M., & Mayer-Proschel, M. (2017). Iron Deficiency Affects Seizure Susceptibility in a Time- and Sex-Specific Manner. *ASN Neuro*, 9(6), 175909141774652. doi:10.1177/1759091417746521.
- Salgado, J. C., Olivera-Nappa, A., Gerdtzen, Z. P., Tapia, V., Theil, E. C., Conca, C., & Nuñez, M. T. (2010). Mathematical modeling of the dynamic storage of iron in ferritin. *BMC Systems Biology*, 4(1), 147. doi:10.1186/1752-0509-4-147.
- Salkind, N. J. (2010). *Encyclopedia of research design*. Thousand Oaks, California: Sage Publications.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A., & Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21(1), 1–26. doi:10.1007/s10565-005-0085-6.
- San Martin, C. D., Garri, C., Pizarro, F., Walter, T., Theil, E. C., & Núñez, M. T. (2008). Caco-2 Intestinal Epithelial Cells Absorb Soybean Ferritin by μ 2 (AP2)-Dependent Endocytosis. *The Journal of Nutrition*, 138(4), 659–666. doi:10.1093/jn/138.4.659.
- Sangkhae, V., & Nemeth, E. (2018). Placental iron transport: The mechanism and regulatory circuits. *Free Radical Biology and Medicine*. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.001.
- Scheers, N. (2013). Regulatory Effects of Cu, Zn, and Ca on Fe Absorption: The Intricate Play between Nutrient Transporters. *Nutrients*, 5(3), 957–970. doi:10.3390/nu5030957.
- Scheers, N., & Sandberg, A. S. (2014). Iron Transport through Ferroportin Is Induced by Intracellular Ascorbate and Involves IRP2 and HIF2 α . *Nutrients*, 6(1), 249–260. doi:10.3390/nu6010249.
- Schenborn, E. T., & Goiffon, V. (2000). DEAE-Dextran Transfection of Mammalian Cultured Cells. *Methods Mol Biol.*, 130:147–153. doi:10.1385/1-59259-686-x:147. PMID: 10589428.
- Sebastiani, G., Wilkinson, N., & Pantopoulos, K. (2016). Pharmacological Targeting of the Hepcidin/Ferroportin Axis. *Frontiers in Pharmacology*, 7. doi:10.3389/fphar.2016.00160.
- Seriki, S. A., Adebayo, O. F., & Odetola, A. O. (2017). Iron: From Dietary Sources to Utilization in the Body. *Glob J Nano*, 3(3), 555615. doi:10.19080/GJN.2017.03.555615.
- Shah, Y. M., Matsubara, T., Ito, S., Yim, S. H., & Gonzalez, F. J. (2009). Intestinal Hypoxia-Inducible Transcription Factors Are Essential for Iron Absorption following Iron Deficiency. *Cell Metabolism*, 9(2), 152–164. doi:10.1016/j.cmet.2008.12.012.
- Shah, G. (1999). Why do we still use serum in the production of biopharmaceuticals? *Dev Biol Stand.*, 99:17-22. PMID: 10404871.
- Sharma, S., Murphy, S. P., Wilkens, L. R., Au, D., Shen, L., & Kolonel, L. N. (2003). Extending a multiethnic food composition table to include standardized food group servings. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(4), 485–495. doi:10.1016/s0889-1575(03)00015-2.

- Sharp, P., & Srai, S.K. (2007). Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World Journal of Gastroenterology*, 13(35), 4716. doi:10.3748/wjg.v13.i35.4716.
- Shawki, A., Mackenzie, B. (2010). Interaction of calcium with the human divalent metal-ion transporter-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 393, 471–475. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.025.
- Shawki, A., Anthony, S. R., Nose, Y., Engevik, M. A., Niespodzany, E. J., Barrientos, T., Öhrvik, H., Worrell, R. T., Thiele, D. J., Mackenzie, B. (2015). Intestinal DMT1 is critical for iron absorption in the mouse but is not required for the absorption of copper or manganese. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(8), G635–G647. doi:10.1152/ajpgi.00160.2015.
- Shen, J., Wilbon, A. S., Zhou, M. & Pan. Y. (2023). Mechanism of Ca²⁺ transport by ferroportin. *eLife*, 12:e82947. doi: 10.7554/eLife.82947.
- Shi, B., Xue, M., Wang, Y., Wang, Y., Li, D., Zhao, X., Li, X. (2018). An improved method for increasing the efficiency of gene transfection and transduction. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.*, 10(2):95-104. PMID: 29755642; PMCID: PMC5943608.
- Silva, M. de L. C., Speridião, P. da G. L., Marciano, R., Amâncio, O. M. S., Morais, T. B. de, & Morais, M. B. de. (2017). Intestinal absorption of iron and calcium from soy and cow's milk-based infant formulas in weanling rats pups. *Revista de Nutrição*, 30(1), 13–22. doi:10.1590/1678-98652017000100002.
- Šimčíková, M., Prather, K. L. J., Prazeres, D. M. F., & Monteiro, G. A. (2015). Towards effective non-viral gene delivery vector. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 31(1-2), 82–107. doi:10.1080/02648725.2016.1178011. PMID: 27160661.
- Smirnoff, N. (2018). Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033.
- Smirnov, N. (1939). On the Estimation of Discrepancy between Empirical Curves of Distribution for Two Independent Samples. *Bulletin Mathématique de L'Université de Moscow*: 2(2), 3-11.
- Sokoll, L. J., & Dawson-Hughes, B. (1992). Calcium supplementation and plasma ferritin concentrations in premenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 56(6), 1045–1048. doi:10.1093/ajcn/56.6.1045.
- Song, L., Hennink, E. J., Young, I. T., & Tanke, H. J. (1995). Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 68(6), 2588–2600. doi:10.1016/s0006-3495(95)80442-x. PMID: 7647262; PMCID: PMC1282169.
- Sork, H., Nordin, J. Z., Turunen, J. J., Wiklander, O. P., Bestas, B., Zaghoul, E. M., Margus, H., Padari, K., Duru, A.D., Corso, G., Bost, J., Vader, P., Pooga, M., Smith, C.E., Wood, M.J., Schiffelers, R.M., Hällbrink, M., Andaloussi, S. E. (2016). Lipid-based Transfection Reagents Exhibit Cryo-induced Increase in Transfection Efficiency. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 5, e290. doi:10.1038/mtna.2016.8. PMID: 27111416; PMCID: PMC5014464.
- Spangler, B., Morgan, C.W., Fontaine, S.D., Vander Wal, M.N., Chang, C.J., Wells, J.A., Renslo, A.R. (2016). A reactivity-based probe of the intracellular labile ferrous iron pool. *Nat Chem Biol*, 12(9), 680-685. doi: 10.1038/nchembio.2116.
- Spiess, A.-N., & Neumeyer, N. (2010). An evaluation of R² as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach. *BMC Pharmacology*, 10(1), 6. doi:10.1186/1471-2210-10-6.

- Sproles, A.E. (2017). Nutritional Interactions in the Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis and their Role in Symbiosis Establishment. Dissertation thesis. University of Wellington, Wellington, NZ.
- Srigiridhar, K., Madhavan Nair, K., Subramanian, R., & Singotamu, L. (2001). Oral repletion of iron induces free radical mediated alterations in the gastrointestinal tract of rat. *Mol Cell Biochem* 219, 91–98. doi:10.1023/A:1011023111048.
- Steele, M. & Chaseling, J. (2006). Powers of Discrete Goodness-of-Fit Test Statistics for a Uniform Null Against a Selection of Alternative Distributions. *Comm Statist Simulation Comput*, 35(4), 1067-1075. doi: 10.1080/03610910600880666.
- Stewart, M. P., Sharei, A., Ding, X., Sahay, G., Langer, R., & Jensen, K. F. (2016). In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery. *Nature*, 538(7624), 183–192. doi:10.1038/nature19764. PMID: 27734871.
- Straub, D. A. (2007). Calcium Supplementation in Clinical Practice: A Review of Forms, Doses, and Indications. *Nutrition in Clinical Practice*, 22(3), 286–296. doi:10.1177/0115426507022003286.
- Su, M. A., Trenor, C. C., Fleming, J. C., Fleming, M. D., Andrews, N. C. (1998). The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2. *Blood*, 92(6), 2157-2163. doi: 10.1182/blood.v92.6.2157.
- Suhling, K., Siegel, J., Phillips, D., French, P. M. W., Lévêque-Fort, S., Webb, S. E. D., & Davis, D. M. (2002). Imaging the Environment of Green Fluorescent Protein. *Biophysical Journal*, 83(6), 3589–3595. doi:10.1016/s0006-3495(02)75359-9. PMID: 12496126; PMCID: PMC1302434.
- Suzuki, M., Shimokawa, H., Takagi, Y., & Sasaki, S. (1994). Calcium-binding properties of fetuin in fetal bovine serum. *Journal of Experimental Zoology*, 270(6), 501–507. doi:10.1002/jez.1402700603.
- Tabuchi, M., Yoshimori, T., Yamaguchi, K., Yoshida, T., & Kishi, F. (2000). Human NRAMP2/DMT1, Which Mediates Iron Transport across Endosomal Membranes, Is Localized to Late Endosomes and Lysosomes in HEp-2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 22220–22228. doi:10.1074/jbc.m001478200.
- Tabuchi, M., Tanaka, N., Nishida-Kitayama, J., Ohno, H., & Kishi, F. (2002). Alternative Splicing Regulates the Subcellular Localization of Divalent Metal Transporter 1 Isoforms. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4371–4387. doi:10.1091/mbc.e02-03-0165.
- Taddy, M. (2019). *Business Data Science: Combining Machine Learning and Economics to Optimize, Automate, and Accelerate Business Decisions*. New York: McGraw-Hill. ISBN 978-1-260-45277-8.
- Takenaka, T., Harada, N., Kuze, J., Chiba, M., Iwao, T., & Matsunaga, T. (2014). Human Small Intestinal Epithelial Cells Differentiated from Adult Intestinal Stem Cells as a Novel System for Predicting Oral Drug Absorption in Humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 42(11), 1947–1954. doi:10.1124/dmd.114.059493.
- Tapia, V., Arredondo, M., & Nuñez, M. T. (1996). Regulation of Fe absorption by cultured intestinal epithelia (Caco-2) cell monolayers with varied Fe status. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 271(3), G443–G447. doi:10.1152/ajpgi.1996.271.3.g443.
- Tarifeño-Saldivia, E., Aguilar, A., Contreras, D., Mercado, L., Morales-Lange, B., Márquez, K., Henríquez, A., Riquelme-Vidal, C., & Boltana, S. (2018). Iron Overload Is

- Associated With Oxidative Stress and Nutritional Immunity During Viral Infection in Fish. *Frontiers in Immunology*, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.01296.
- Tavelin, S., Taipalensuu, J., Söderberg, L., Morrison, R., Chong, S., & Artursson, P. (2003). *Pharmaceutical Research*, 20(3), 397–405. doi:10.1023/a:1022699920043.
- Taylor, M., Qu, A., Anderson, E. R., Matsubara, T., Martin, A., Gonzalez, F. J., & Shah, Y. M. (2011). Hypoxia-Inducible Factor-2 α Mediates the Adaptive Increase of Intestinal Ferroportin During Iron Deficiency in Mice. *Gastroenterology*, 140(7), 2044–2055. doi:10.1053/j.gastro.2011.03.007.
- Tenopoulou, M., Kurz, T., Doulias, P.T., Galaris, D., Brunk, U.T. (2007). Does the calcein-AM method assay the total cellular “labile iron pool” or only a fraction of it? *Biochemical Journal*: 403(2), 261–266, 2007. doi:10.1042/bj20061840.
- Teucher, Olivares, & Cori. (2004). Enhancers of Iron Absorption: Ascorbic Acid and other Organic Acids. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 74(6), 403–419. doi:10.1024/0300-9831.74.6.403.
- Thankachan, P., Walczyk, T., Muthayya, S., Kurpad, A. V., & Hurrell, R. F. (2008). Iron absorption in young Indian women: the interaction of iron status with the influence of tea and ascorbic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(4), 881–886. doi:10.1093/ajcn/87.4.881.
- Thomas, C. & Oates, P.S. (2004). Ferroportin/IREG-1/MTP-1/SLC40A1 modulates the uptake of iron at the apical membrane of enterocytes. *Gut*, 53(1), 44–49. doi:10.1136/gut.53.1.44.
- Thompson, B. A. V., Sharp, P. A., Elliott, R., & Fairweather-Tait, S. J. (2010). Inhibitory Effect of Calcium on Non-heme Iron Absorption May Be Related to Translocation of DMT-1 at the Apical Membrane of Enterocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8414–8417. doi:10.1021/jf101388z.
- Thumser, A. E., Rashed, A. A., Sharp, P. A., & Lodge, J. K. (2010). Ascorbate enhances iron uptake into intestinal cells through formation of a FeCl₃-ascorbate complex. *Food Chemistry*, 123(2), 281–285. doi:10.1016/j.foodchem.2010.04.031.
- Tidehag, P., Sandberg, A. S., Hallmans, G., Wing, K., Türk, M., Holm, S., & Grahn, E. (1995). Effect of milk and fermented milk on iron absorption in ileostomy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1234–1238. doi:10.1093/ajcn/62.6.1234.
- Tietz, N. W. (1995). *Clinical Guide to Laboratory Tests*. (3rd ed.). Philadelphia: W.B. Saunders.
- Toyohara, H., Yamamoto, S., Hosoi, M., Takagi, M., Hayashi, I., Nakao, K., & Kaneko, S. (2005). Scallop DMT functions as a Ca²⁺ transporter. *FEBS Lett*, 579(12), 2727–30. doi: 10.1016/j.febslet.2005.03.082.
- Tsai, T. Y.-C., Choi, Y. S., Ma, W., Pomeroy, J. R., Tang, C., & Ferrell, J. E. (2008). Robust, Tunable Biological Oscillations from Interlinked Positive and Negative Feedback Loops. *Science*, 321(5885), 126–129. doi:10.1126/science.1156951.
- Tuntawiroon, M., Sritongkul, N., Brune, M., Rossander-Hultén, L., Pleehachinda, R., Suwanik, R., & Hallberg, L. (1991). Dose-dependent inhibitory effect of phenolic compounds in foods on nonheme-iron absorption in men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(2), 554–557. doi:10.1093/ajcn/53.2.554.
- Tuntipopipat, S., Judprasong, K., Zeder, C., Wasantwisut, E., Winichagoon, P., Charoenkiatkul, S., Hurrell, R. F., & Walczyk, T. (2006). Chili, but Not Turmeric,

- Inhibits Iron Absorption in Young Women from an Iron-Fortified Composite Meal. *The Journal of Nutrition*, 136(12), 2970–2974. doi:10.1093/jn/136.12.2970.
- Turco, L., Catone, T., Caloni, F., Consiglio, E. D., Testai, E., & Stammati, A. (2011). Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicology in Vitro*, 25(1), 13–20. doi:10.1016/j.tiv.2010.08.009.
- Uskova, M. A., Borst, J.-W., Hink, M. A., van Hoek, A., Schots, A., Klyachko, N. L., & Visser, A. J. W. (2000). Fluorescence dynamics of green fluorescent protein in AOT reversed micelles. *Biophysical Chemistry*, 87(1), 73–84. doi:10.1016/s0301-4622(00)00184-8.
- Van den Engh, G., & Farmer, C. (1992). Photo-bleaching and photon saturation in flow cytometry. *Cytometry*, 13(7), 669–677. doi:10.1002/cyto.990130702.
- Van de Graaf, S. F. J., Boullart, I., Hoenderop, J. G. J., & Bindels, R. J. M. (2004). Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 by 1 α ,25-dihydroxy Vitamin D3 and dietary Ca²⁺. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 89-90, 303–308. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.03.029.
- Van de Graaf, S. F. J., Hoenderop, J. G. J., & Bindels, R. J. M. (2006). Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 290(6), F1295–F1302. doi:10.1152/ajprenal.00443.2005.
- Veuthey, T., & Wessling-Resnick, M. (2014). Pathophysiology of the Belgrade rat. *Frontiers in Pharmacology*, 5. doi:10.3389/fphar.2014.00082.
- Vicente, N. B., Zamboni, J. E. D., Adur, J. F., Paravani, E. V., & Casco, V. H. (2007). Photobleaching correction in fluorescence microscopy images. *Journal of Physics: Conference Series*, 90, 012068. doi:10.1088/1742-6596/90/1/012068.
- Viera, L., Ortiz, L., & Ramírez, S. (2010). *Introducción a la Minería de Datos*. Editora e-papers.
- Villarroel, P., Flores, S., Pizarro, F., de Romaña, D. L., & Arredondo, M. (2011). Effect of dietary protein on heme iron uptake by Caco-2 cells. *European Journal of Nutrition*, 50(8), 637–643. doi:10.1007/s00394-011-0173-8.
- Visser, A. J. W. G., Laptinok, S. P., Visser, N. V., van Hoek, A., Birch, D. J. S., Brochon, J.-C., & Borst, J. W. (2009). Time-resolved FRET fluorescence spectroscopy of visible fluorescent protein pairs. *European Biophysics Journal*, 39(2), 241–253. doi:10.1007/s00249-009-0528-8.
- Voet, D., Voet, J.G. (2010). Rates of Enzymatic Reactions. In: *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., p. 482-505.
- Vostal, J.G., & Shafer, B. (1996). Thapsigargin-induced Calcium Influx in the Absence of Detectable Tyrosine Phosphorylation in Human Platelets. *J Biol Chem*: 271(32), 19524-19529. doi: 10.1074/jbc.271.32.19524.
- Walczyk, T., Davidsson, L., Rossander-Hulthen, L., Hallberg, L., & Hurrell, R. F. (2003). No enhancing effect of vitamin A on iron absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(1), 144–149. doi:10.1093/ajcn/77.1.144.
- Walczyk, T., Kastenmayer, P., Storcksdieck genannt Bonsmann, S., Zeder, C., Grathwohl, D., & Hurrell, R. F. (2013). Ferrous ammonium phosphate (FeNH₄PO₄) as a new food fortificant: iron bioavailability compared to ferrous sulfate and ferric pyrophosphate from an instant milk drink. *European Journal of Nutrition*, 52(4), 1361–1368. doi:10.1007/s00394-012-0445-y.

- Walczyk, T., Muthayya, S., Wegmüller, R., Thankachan, P., Sierksma, A., Frenken, L. G. J., Thomas, T., Kurpad, A. & Hurrell, R. F. (2014). Inhibition of Iron Absorption by Calcium Is Modest in an Iron-Fortified, Casein- and Whey-Based Drink in Indian Children and Is Easily Compensated for by Addition of Ascorbic Acid. *The Journal of Nutrition*, 144(11), 1703–1709. doi:10.3945/jn.114.193417.
- Walden, W. E., Selezneva, A. I., Dupuy, J., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C., Theil, E. C., & Volz, K. (2006). Structure of Dual Function Iron Regulatory Protein 1 Complexed with Ferritin IRE-RNA. *Science*, 314(5807), 1903–1908. doi:10.1126/science.1133116.
- Wallace, T. C., McBurney, M., & Fulgoni, V. L. (2014). Multivitamin/Mineral Supplement Contribution to Micronutrient Intakes in the United States, 2007–2010. *Journal of the American College of Nutrition*, 33(2), 94–102. doi:10.1080/07315724.2013.846806.
- Wallander, M. L., Leibold, E. A., & Eisenstein, R. S. (2006). Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1763(7), 668–689. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.05.004.
- Wang, L., Li, Q., Duan, X.L., Chang, Y.Z. (2005). Effects of extracellular iron concentration on calcium absorption and relationship between Ca²⁺ and cell apoptosis in Caco-2 cells. *World J Gastroenterol*. 2005 May 21;11(19):2916-21. doi: 10.3748/wjg.v11.i19.2916. PMID: 15902728; PMCID: PMC4305659.
- Wang, Z., Gao, H., Zhang, Y., Liu, G., Niu, G., & Chen, X. (2017). Functional ferritin nanoparticles for biomedical applications. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 11(4), 633–646. doi:10.1007/s11705-017-1620-8.
- Wang, X., Flores, S. R., Ha, J.-H., Doguer, C., Woloshun, R. R., Xiang, P., Grosche, A., Vidyasagar, S., & Collins, J. F. (2018). Intestinal DMT1 Is Essential for Optimal Assimilation of Dietary Copper in Male and Female Mice with Iron-Deficiency Anemia. *The Journal of Nutrition*, 148(8), 1244–1252. doi:10.1093/jn/nxy111.
- Washbourne, P., & McAllister, A. K. (2002). Techniques for gene transfer into neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(5), 566–573. doi:10.1016/s0959-4388(02)00365-3.
- Wauben, I. P. M., & Atkinson, S. A. (1999). Calcium Does Not Inhibit Iron Absorption or Alter Iron Status in Infant Piglets Adapted to a High Calcium Diet. *The Journal of Nutrition*, 129(3), 707–711. doi:10.1093/jn/129.3.707.
- Weaver, C. M., & Heaney, R. P. (Eds.). (2006). *Calcium in Human Health*. Totowa: Humana Press. Chapter 8, Dietary calcium; pp. 105–128. doi:10.1007/978-1-59259-961-5.
- Weaver, C. & Heaney, R. (2014). Calcium In: Ross A, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR. (ed.). *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lippincott Williams & Wilkins / Wolters Kluwer, Baltimore. pp. 133–149.
- Wawer, A. A., Harvey, L. J., Dainty, J. R., Perez-Moral, N., Sharp, P., & Fairweather-Tait, S. J. (2014). Alginate Inhibits Iron Absorption from Ferrous Gluconate in a Randomized Controlled Trial and Reduces Iron Uptake into Caco-2 Cells. *PLoS ONE*, 9(11), e112144. doi:10.1371/journal.pone.0112144.
- Weaver, C. M. (2020). Calcium. En: Marriott, B. P., Birt, D. F., Stallings, V. A., Yates, A. A., (Eds.), *Present Knowledge in Nutrition*. (11va ed., pp. 321-348). Cambridge, Massachusetts: Wiley-Blackwell.
- Whittaker, P. (1998). Iron and zinc interactions in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68(2), 442S–446S. doi:10.1093/ajcn/68.2.442s.

- Wie, M. B., Koh, J. Y., Won, M. H., Lee, J. C., Shin, T. K., Moon, C. J., Ha, H. J., Park, S. M., & Kim, H. C. (2001). BAPTA/AM, an intracellular calcium chelator, induces delayed necrosis by lipoxygenase-mediated free radicals in mouse cortical cultures. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(8), 1641–1659. doi:10.1016/s0278-5846(01)00202-0.
- Wienk, K. J. H., Marx, J. J. M., Lemmens, A. G., Brink, E. J., Van Der Meer, R., & Beynen, A. C. (1996). Mechanism underlying the inhibitory effect of high calcium carbonate intake on iron bioavailability from ferrous sulphate in anaemic rats. *British Journal of Nutrition*, 75(01), 109. doi:10.1079/bjn19960114.
- Wienk, K. J. H., Marx, J. J. M., & Beynen, A. C. (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. *European Journal of Nutrition*, 38(2), 51–75. doi:10.1007/s003940050046.
- Wiesner, T. F., Berk, B. C., & Nerem, R. M. (1997). A mathematical model of the cytosolic-free calcium response in endothelial cells to fluid shear stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(8), 3726–3731. doi:10.1073/pnas.94.8.3726.
- Włodarczyk, J., & Kierdaszuk, B. (2003). Interpretation of Fluorescence Decays using a Power-like Model. *Biophysical Journal*, 85(1), 589–598. doi:10.1016/s0006-3495(03)74503-2.
- Worthington, M., Browne, L., Battle, E., Luo, R. (2000). Functional properties of transfected human DMT1 iron transporter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279(6), G1265-G1273. doi:10.1152/ajpgi.2000.279.6.G1265.
- Wrench, I. J., Brown, T. J., Brown, B. L., & Dobson, P. R. M. (1988). The effect of fetal calf serum on intracellular calcium in GH 3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 156(3), 1411–1418. doi:10.1016/s0006-291x(88)80789-7.
- Xu, H., Jin, J., DeFelice, L. J., Andrews, N. C., & Clapham, D. E. (2004). A Spontaneous, Recurrent Mutation in Divalent Metal Transporter-1 Exposes a Calcium Entry Pathway. *PLoS Biology*, 2(3), e50. doi:10.1371/journal.pbio.0020050.
- Xue, Y., & Fleet, J. C. (2009). Intestinal Vitamin D Receptor Is Required for Normal Calcium and Bone Metabolism in Mice. *Gastroenterology*, 136(4), 1317–1327.e2. doi:10.1053/j.gastro.2008.12.051.
- Yamaji, S., Tennant, J., Tandy, S., Williams, M., Singh Srani, S. K., & Sharp, P. (2001). Zinc regulates the function and expression of the iron transporters DMT1 and IREG1 in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters*, 507(2), 137–141. doi:10.1016/s0014-5793(01)02953-2.
- Yamano, S., Dai, J., & Moursi, A. M. (2010). Comparison of Transfection Efficiency of Nonviral Gene Transfer Reagents. *Molecular Biotechnology*, 46(3), 287–300. doi:10.1007/s12033-010-9302-5.
- Yanatori, I., Richardson, D., Imada, K., & Kishi, F. (2016). Iron Export through the Transporter Ferroportin 1 Is Modulated by the Iron Chaperone PCBP2. *J Biol Chem*, 291(33), 17303–17318. doi: 10.1074/jbc.M116.721936.
- Yanatori, I., Richardson, D. R., Toyokuni, S., & Kishi, F. (2017). The iron chaperone poly(rC)-binding protein 2 forms a metabolon with the heme oxygenase 1/cytochrome P450 reductase complex for heme catabolism and iron transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 292(32), 13205–13229. doi:10.1074/jbc.m117.776021.
- Yanatori, I., & Kishi, F. (2018). DMT1 and iron transport. *Free Radic Biol Med*, 133, 55–63. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.020.

- Yang, F., Wang, X., Haile, D. J., Piantadosi, C. A., & Ghio, A. J. (2002). Iron increases expression of iron-export protein MTP1 in lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283(5), L932-L939. doi: 10.1152/ajplung.00114.2002.
- Yeh, K.Y., Yeh, M., Watkins, J.A., Rodriguez-Paris, J., Glass J. (2000). Dietary iron induces rapid changes in rat intestinal divalent metal transporter expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279(5):G1070-9. doi: 10.1152/ajpgi.2000.279.5.G1070. PMID: 11053005.
- Yeh, K., Yeh, M., & Glass, J. (2011). Interactions between ferroportin and hephaestin in rat enterocytes are reduced after iron ingestion. *Gastroenterology*, 141(1), 292-9, 299.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2011.03.059.
- Yeung, A. C., Glahn, R. P., & Miller, D. D. (2001). Dephosphorylation of sodium caseinate, enzymatically hydrolyzed casein and casein phosphopeptides by intestinal alkaline phosphatase: implications for iron availability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(5), 292–299. doi:10.1016/s0955-2863(01)00141-3.
- Yiannikourides, A., & Latunde-Dada, G. (2019). A Short Review of Iron Metabolism and Pathophysiology of Iron Disorders. *Medicines*, 6(3), 85. doi:10.3390/medicines6030085.
- York, E.M., Weilingner, N.L., LeDue, J.M., MacVicar, B.A. (2019). Green fluorescent protein emission obscures metabolic fluorescent lifetime imaging of NAD(P)H. *Biomed Opt Express*.10(9):4381-4394. doi: 10.1364/BOE.10.004381. PMID: 31565496; PMCID: PMC6757450.
- Yoshida, I., Monji, A., Tashiro, K., Nakamura, K., Inoue, R., Kanba, S. (2006). Depletion of intracellular Ca²⁺ store itself may be a major factor in thapsigargin-induced ER stress and apoptosis in PC12 cells. *Neurochem Int*: 48(8), 696-702. doi: 10.1016/j.neuint.2005.12.012.
- Yikilmaz, E., Rouault, T. A., & Schuck, P. (2005). Self-Association and Ligand-Induced Conformational Changes of Iron Regulatory Proteins 1 and 2. *Biochemistry*, 44(23), 8470–8478. doi:10.1021/bi0500325.
- Yu, X., Chen, L., Ding, H., Zhao, Y., Feng, J. (2019). Iron Transport from Ferrous Bisglycinate and Ferrous Sulfate in DMT1-Knockout Human Intestinal Caco-2 Cells. *Nutrients*: 11(3), 485, 2019. doi: 10.3390/nu11030485.
- Yun, S., Habicht, J. P., Miller, D. D., & Glahn, R. P. (2004). An In Vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture System Accurately Predicts the Effects of Ascorbic Acid and Polyphenolic Compounds on Iron Bioavailability in Humans. *The Journal of Nutrition*, 134(10), 2717–2721. doi:10.1093/jn/134.10.2717.
- Zhang, A. S., & Enns, C. A. (2008). Iron Homeostasis: Recently Identified Proteins Provide Insight into Novel Control Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 284(2), 711–715. doi:10.1074/jbc.r800017200.
- Zhang, D. L., Hughes, R.M., Ollivierre-Wilson, H., Ghosh, M.C., & Rouault, T.A. (2009). A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab*, 9, 461–473. doi: 10.1016/j.cmet.2009.03.006.
- Zhang, D. L., Senecal, T., Ghosh, M. C., Ollivierre-Wilson, H., Tu, T., Rouault, T. A. (2011). Hepcidin regulates ferroportin expression and intracellular iron homeostasis of erythroblasts. *Blood*, 118(10), 2868–2877. doi: 10.1182/blood-2011-01-330241.

- Zhi, D., Bai, Y., Yang, J., Cui, S., Zhao, Y., Chen, H., & Zhang, S. (2018). A review on cationic lipids with different linkers for gene delivery. *Adv Colloid Interface Sci.*, 253:117-140. doi: 10.1016/j.cis.2017.12.006. Epub 2017 Dec 26. PMID: 29454463.
- Zhu, J. X., Zhang, G. H., Yang, N., Rowlands, D. K., Wong, H. Y. C., Tsang, L. L., Chung, H. C., & Chan, H. C. (2005). Activation of apical CFTR and basolateral Ca²⁺-activated K⁺ channels by tetramethylpyrazine in Caco-2 cell line. *European Journal of Pharmacology*, 510(3), 187–195. doi:10.1016/j.ejphar.2005.01.026.
- Zijp, I. M., Korver, O., & Tijburg, L. B. M. (2000). Effect of Tea and Other Dietary Factors on Iron Absorption. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(5), 371–398. doi:10.1080/10408690091189194.
- Zödl, B., Humpeler, S., Zeiner, M., Gundacker, C., Steffan, I., & Ekmekcioglu, C. (2010). Ascorbic Acid Mediated Iron Toxicity in Caco-2 Cells: Effects of Different Iron Species. *Cell Membranes and Free Radical Research*, 2(2), 92-97.
- Zoller, H., Theurl, I., Koch, R., Kaser, A., & Weiss, G. (2002). Mechanisms of Iron Mediated Regulation of the Duodenal Iron Transporters Divalent Metal Transporter 1 and Ferroportin 1. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 29(3), 488–497. doi:10.1006/bcmd.2002.0587.
- Zou, S.Q., Qu, Z.L., Li, Z.F., Wang, X. (2004). Hepatitis B virus X gene induces human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in cultured normal human cholangiocytes. *World J Gastroenterol*, 10(15):2259-62. doi: 10.3748/wjg.v10.i15.2259. PMID: 15259077; PMCID: PMC4724980.
- Zylberberg, C., Matosevic, S. (2016). Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Deliv.*, 23(9):3319-3329. doi: 10.1080/10717544.2016.1177136. Epub 2016 May 5. PMID: 27145899.

Anexos

A Medios de cultivo utilizados

A.1. Medio MEM con 10 μM de CaCl_2

Para reducir la concentración de Ca^{2+} del medio MEM de 1,8 mM a 10 μM , el programa “MAXCHELATOR, Ca-EGTA Calculator” indicó que, para un pH de 7,0 y una temperatura de 37 °C, la concentración final de EGTA en el medio debe ser de 1,90 mM .

Por lo tanto, para que la concentración final de EGTA en el medio sea de 1,90 mM , se agregaron 49,45 μL de la solución concentrada de EGTA de 384 mM , en 10 mL de medio MEM.

La composición base del medio MEM sin rojo fenol se presenta en la [Figura A1](#).

Composition :			
Ingredients	mg/L	L-Lysine hydrochloride	72.500
		L-Methionine	15.000
		L-Phenylalanine	32.000
INORGANIC SALTS		L-Proline	11.500
Calcium chloride dihydrate	265.000	L-Serine	10.500
Magnesium sulphate anhydrous	97.720	L-Threonine	48.000
Potassium chloride	400.000	L-Tryptophan	10.000
Sodium chloride	6800.000	L-Tyrosine disodium salt	51.900
Sodium dihydrogen phosphate anhydrous	122.000	L-Valine	46.000
AMINO ACIDS		VITAMINS	
Glycine	7.500	Choline chloride	1.000
L-Alanine	8.900	D-Ca-Pantothenate	1.000
L-Arginine hydrochloride	126.000	Folic acid	1.000
L-Asparagine monohydrate	15.000	Nicotinamide	1.000
L-Aspartic acid	13.300	Pyridoxal	1.000
L-Cystine dihydrochloride	31.300	Riboflavin	0.100
L-Glutamic acid	14.700	Thiamine hydrochloride	1.000
L-Glutamine	292.000	i-Inositol	2.000
L-Histidine hydrochloride monohydrate	42.000	OTHERS	
L-Isoleucine	52.000	D-Glucose	1000.000
L-Leucine	52.000	Phenol red sodium salt	11.000
		Sodium pyruvate	110.000

Figura A1. Composición del medio MEM sin rojo fenol.

A.2 Medio MEM con 1,5 mM de CaCl_2

Se usó el programa “MAXCHELATOR, Ca-EGTA Calculator” para calcular concentración final de EGTA a utilizar para reducir la concentración de Ca^{2+} del medio MEM de 1,8 mM a 1,5 mM . El programa indicó que, para un pH de 7,0 y una temperatura de 37 °C, la concentración final de EGTA en el medio debe ser de 0,30 mM .

Por lo tanto, para que la concentración final de EGTA en el medio sea de 0,30 mM , se agregaron 7,81 μL de la solución concentrada de EGTA de 384 mM , en 10 mL de medio MEM.

A.3 Medio MEM con 3 mM de CaCl_2

En medio MEM sin rojo fenol utilizado (Gibco™), contiene 200 mg/L de Cloruro de Calcio (CaCl_2), cuyo peso molecular es 147 g/mol, lo cual equivale a una concentración de 1,8 mM de CaCl_2 en el medio.

La suplementación de MEM con Ca^{2+} a una concentración final de 3 mM, se consiguió realizando los siguientes pasos:

1. Mesar 0,0033 g de CaCl_2 y disolverlos en 10 mL de medio MEM.
2. Esterilizar por filtración, utilizando un filtro de 0,2 mm.
3. Almacenar a 4 °C para su posterior uso.

A.4 Medio DMEM suplementado

El medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM* (Gibco™) se utilizó para el crecimiento de células Caco-2. Para su preparación, se siguieron los siguientes pasos:

1. Disolver en menos de 1 L de agua destilada libre de pirógenos, el contenido de un sobre de medio DMEM junto con 3,7 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), a temperatura ambiente con agitación hasta obtener una mezcla homogénea.
2. Ajustar el pH a 7,0.
3. Completar con agua destilada hasta conseguir un volumen final de 1 L.
4. Esterilizar el medio DMEM por filtración, utilizando un filtro de 0,2 mm, y luego suplementarlo con 1 % de solución Pen Strep (Gibco™) y 10 % de SFB (HyClone™).
5. Almacenar el medio a 4 °C.

A.5 Opti-MEM® I

Opti-MEM® I (*Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium*) (Gibco™), es un Medio Esencial Mínimo (MEM) mejorado, bajo en proteínas que contiene insulina, transferrina, hipoxantina, timidina y oligoelementos que permite una reducción de la suplementación de suero fetal bovino en al menos un 50 % sin cambios en la tasa de crecimiento o la morfología.

Este medio se utilizó junto con Lipofectamina™ (reactivo de transfección de lípidos catiónicos), para diluir Lipofectamina™ 2000 y el ADN plasmídico antes de formar complejos.

A.6 Medio Luria-Bertani (LB)

Se utilizó el medio LB (BD Difco™) para el crecimiento de *E. coli*. Para preparar 250 mL de este medio, se sigue la metodología propuesta en [Sambrook y cols., \(1989\)](#), descrita a continuación:

1. Mesar los siguientes compuestos:
 - Triptona 2,5 g,
 - Extracto de levadura 1,25 g,
 - Cloruro de sodio (NaCl) 2,5 g,
 - Agua destilada hasta completar 250 mL.
2. Ajustar el pH a 7,0.
3. Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente si este no se utiliza inmediatamente.
4. Para crecer *E. coli*, en el medio autoclavado a temperatura ambiente, agregar 100 μL de la solución concentrada de kanamicina, para que la concentración final de antibiótico sea de 30 $\mu\text{g/mL}$.

B. Materiales y Reactivos utilizados

B.1 Antibiótico - Kanamicina

1. Preparar una solución concentrada de kanamicina, disolviendo 0,1 g de kanamicina en 3,333 mL de agua estéril milli-Q.
2. Esterilizar la solución por filtración, utilizando un filtro de 0,2 mm.
3. Almacenar la solución concentrada de kanamicina a -20 °C.
4. Agregar 100 μL del stock en 99,9 mL de medio LB, para obtener 100 mL de medio con kanamicina a concentración final de 30 $\mu\text{g/mL}$.

B.2 Ácido Tetraacético de Etilenglicol (EGTA)

EGTA es un ácido aminopolicarboxílico, un agente quelante que puede usarse para la determinación de calcio en presencia de magnesio, ya que tiene una mayor especificidad por los iones de calcio.

Se preparó una solución concentrada de 384 mM de EGTA como sigue:

1. Pesar 14,592 g de EGTA (sal de sodio) y añadir agua destilada hasta completar 90 mL.
2. Ajustar el pH a 8,0 y mezclar hasta disolver los cristales de EGTA.
3. Añadir agua destilada hasta un volumen final de 100 mL.
4. Esterilizar la solución por filtración, utilizando un filtro de 0,2 mm.
5. Almacenar para uso posterior a -20 °C.

B.3 Solución concentrada de BAPTA-AM

Un vial de BAPTA-AM (Molecular Probes™, Invitrogen™) contiene 1 mg del producto. Considerando que el peso molecular de BAPTA-AM es 764,68 g/mol, el vial contiene 1,31 μmol .

Para preparar una solución concentrada a 1 mM y siguiendo las instrucciones del fabricante, BAPTA-AM del vial se disolvió en 1,31 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se resuspendió abundantemente el contenido para lograr una mezcla homogénea.

Esta solución se almacenó a -20 °C, y se usó a una concentración final de 20 μM .

B.4 Solución concentrada de Calceína-AM

La presentación comercial de Calceína-AM utilizada (Life Technologies™, Invitrogen™) contiene 50 μg , que equivalen a 50,26 nmol teniendo en cuenta que el peso molecular de la Calceína-AM es 994,87 g/mol.

En el vial se agregaron 50,3 μL de DMSO, disolviendo totalmente su contenido, para obtener una solución concentrada de Calceína-AM a 1 mM.

Esta solución se almacenó a -20 °C, y se usó a una concentración final de 1 μM .

B.5 Solución de Sulfato de Amonio Ferroso (FAS)

La solución de FAS fue preparada inmediatamente antes del inicio del experimento ya que se polimeriza rápidamente en soluciones que contienen O₂ (Esparza y col., 2015). La metodología seguida en cada experimento se describe a continuación:

1. Masar en un tubo eppendorf una cantidad menor a 0,1 g de FAS, y calcular el número de moles presentes en ellos, teniendo en cuenta que el peso molecular de FAS es 392,1 g/mol:

$$\frac{392,1 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = \frac{\text{Masa}_{FAS_{\text{eppendorf}}}}{n_{\text{moles}}} \quad (A1)$$

$$n_{\text{moles}} = \text{Masa}_{FAS_{\text{eppendorf}}} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{392,1 \text{ g}} \quad (A2)$$

2. Preparar una solución concentrada de 200 μM de FAS, disolviendo el hierro masado anteriormente en el volumen apropiado de agua recién hervida (para disminuir la concentración de oxígeno)

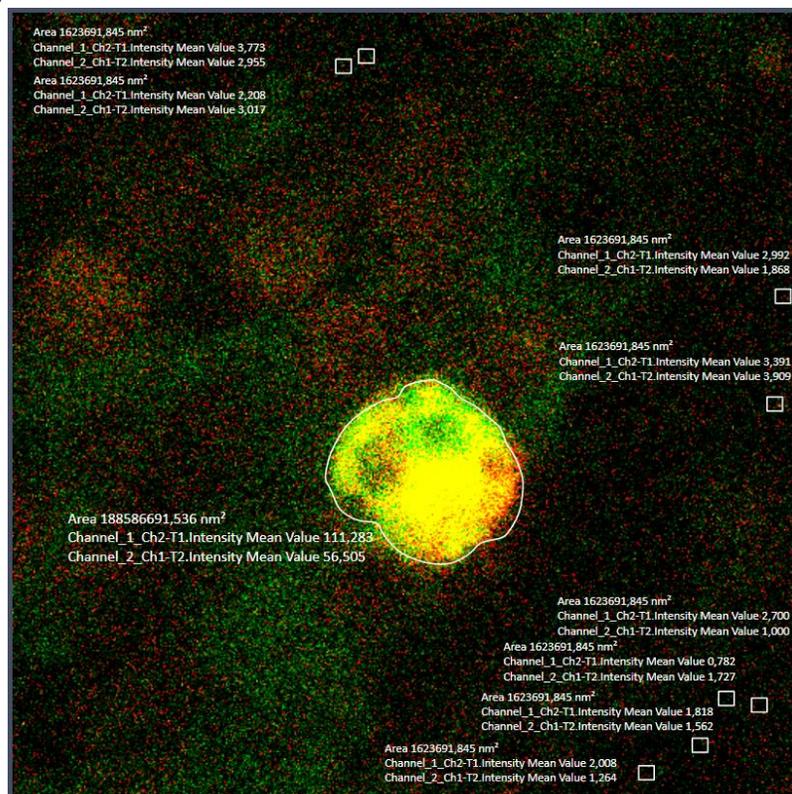
$$V_{\text{agua}_{\text{hervida}}} (\mu\text{L}) = n_{\text{moles}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{200 \mu\text{M}} \quad (A3)$$

En la placa de 24 pocillos, a cada pocillo en estudio agregar 190 μL del medio a analizar y 10 μL de la solución concentrada de FAS, para obtener una concentración final de FAS de 10 μM .

C. Selección de áreas correspondientes a las células analizadas y al *background* de cada inserto

C.1 Selección de las áreas correspondientes a las células Caco-2 analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de $10\ \mu\text{M}$, y del *background* del inserto

(A)



(B)

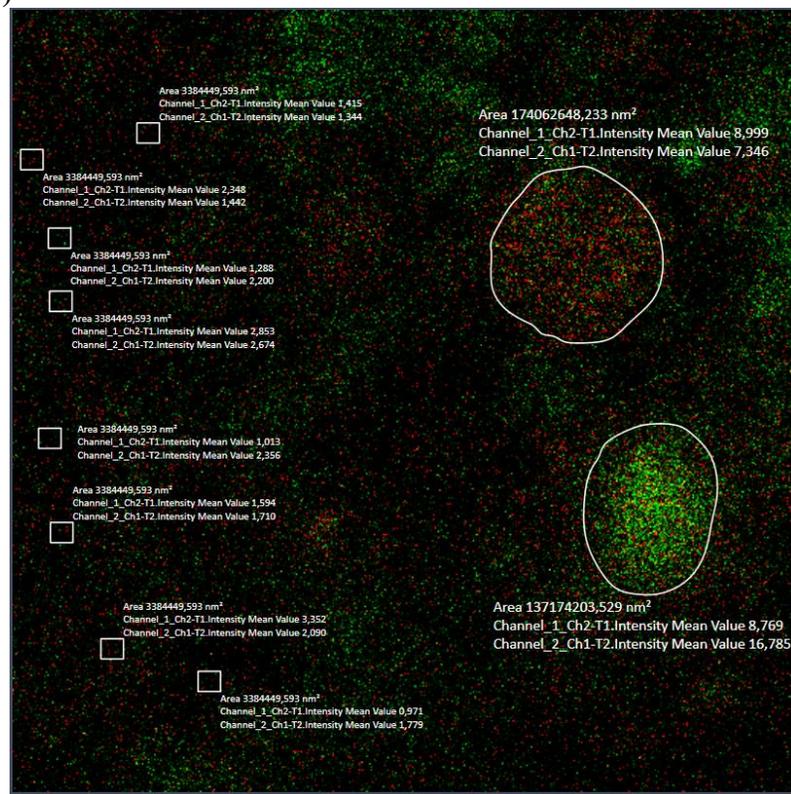
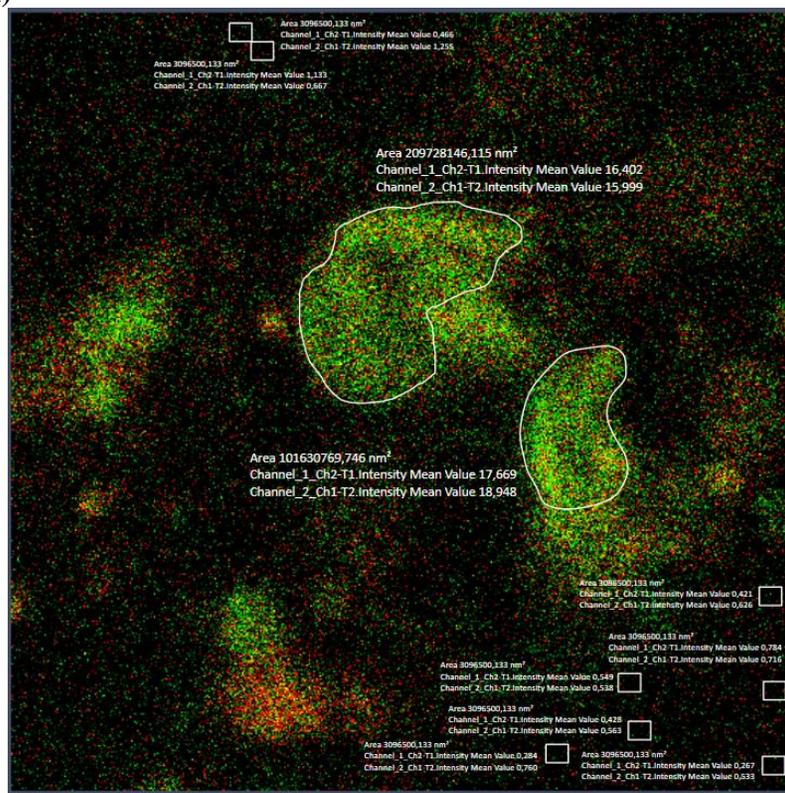


Figura A2. Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #1 y (B) #2 y #3, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de $10\ \mu\text{M}$, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

(A)



(B)

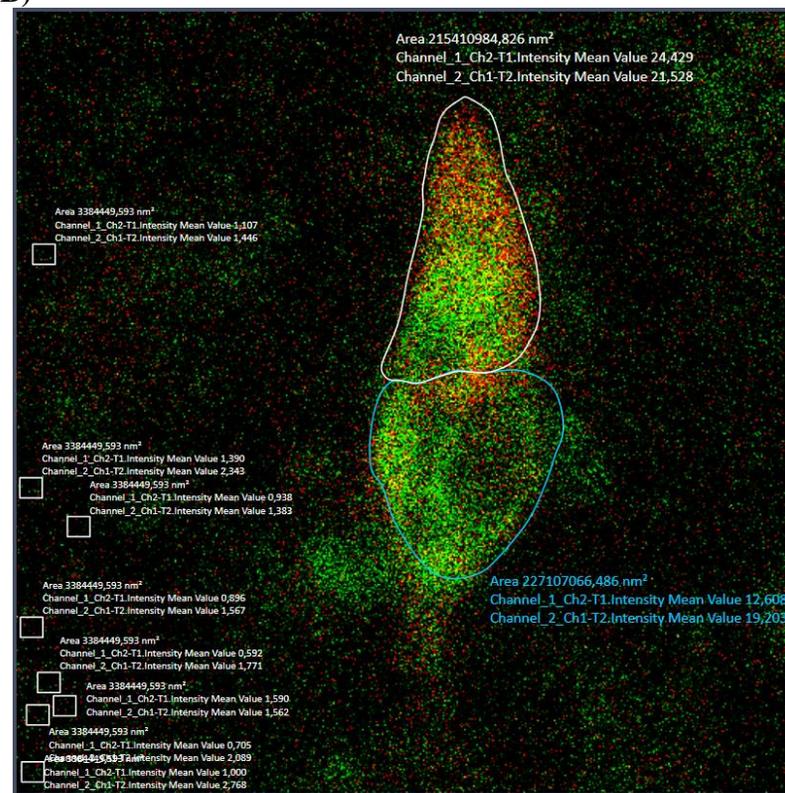
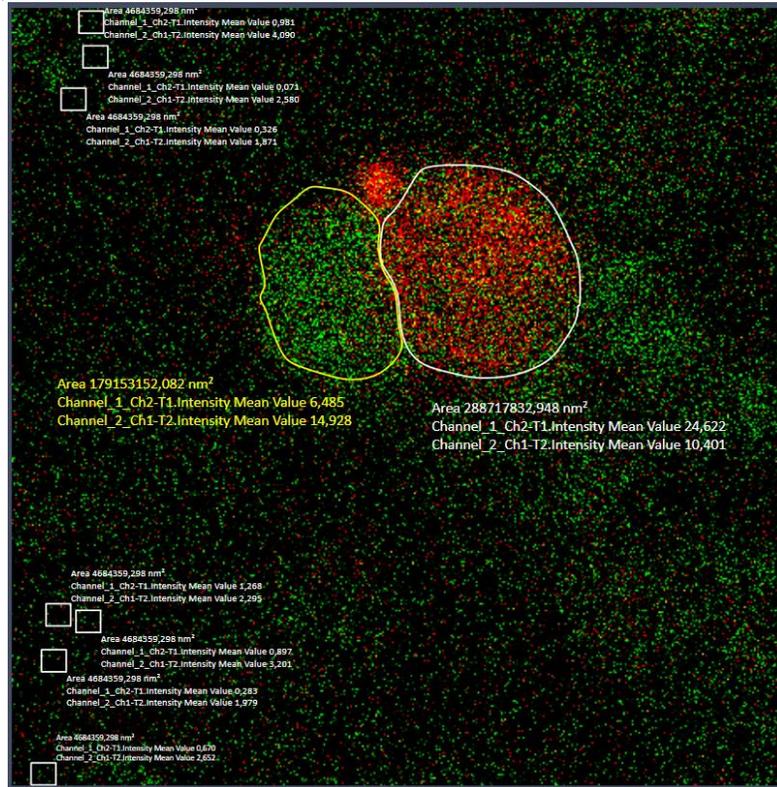


Figura A3. Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #4 y #5 y (B) #6 y #7, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μ M, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

C.2 Selección de las áreas correspondientes a las células Caco-2 analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM, y del background del inserto

(A)



(B)

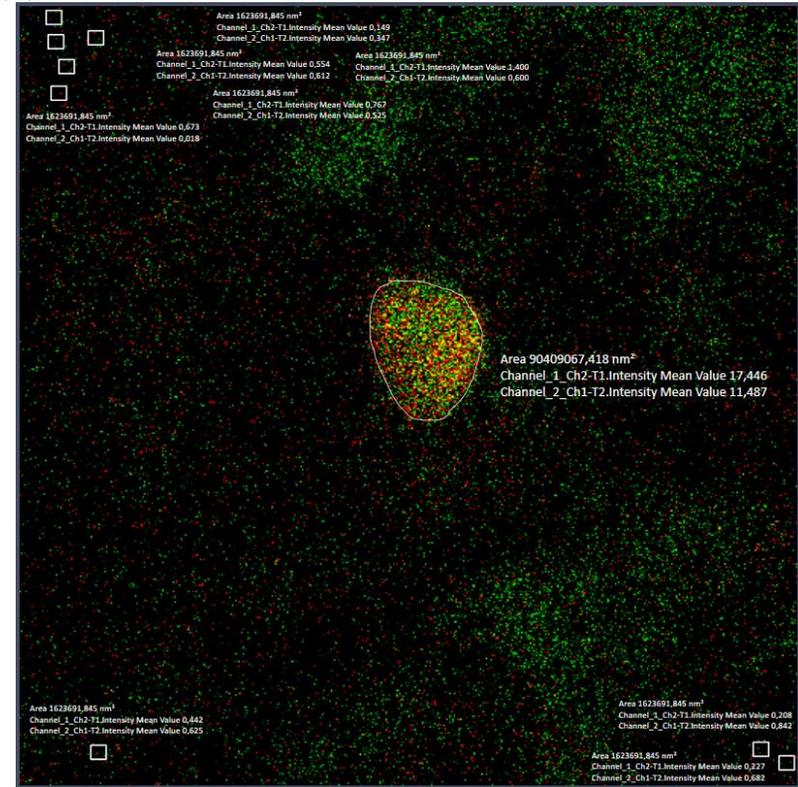
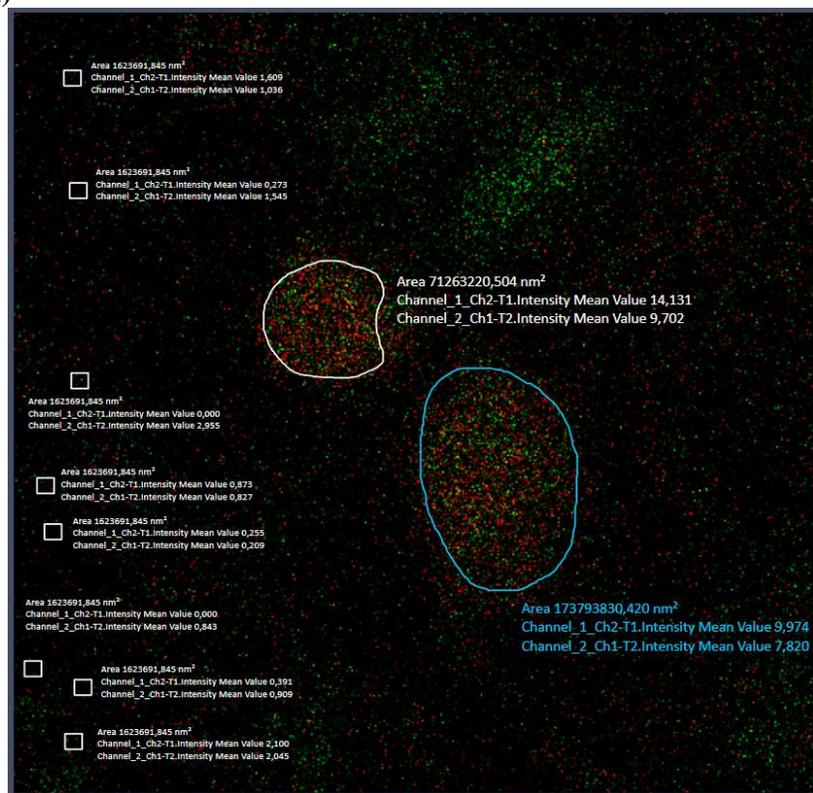


Figura A4. Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #1 y #2 y (B) #3, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

(A)



(B)

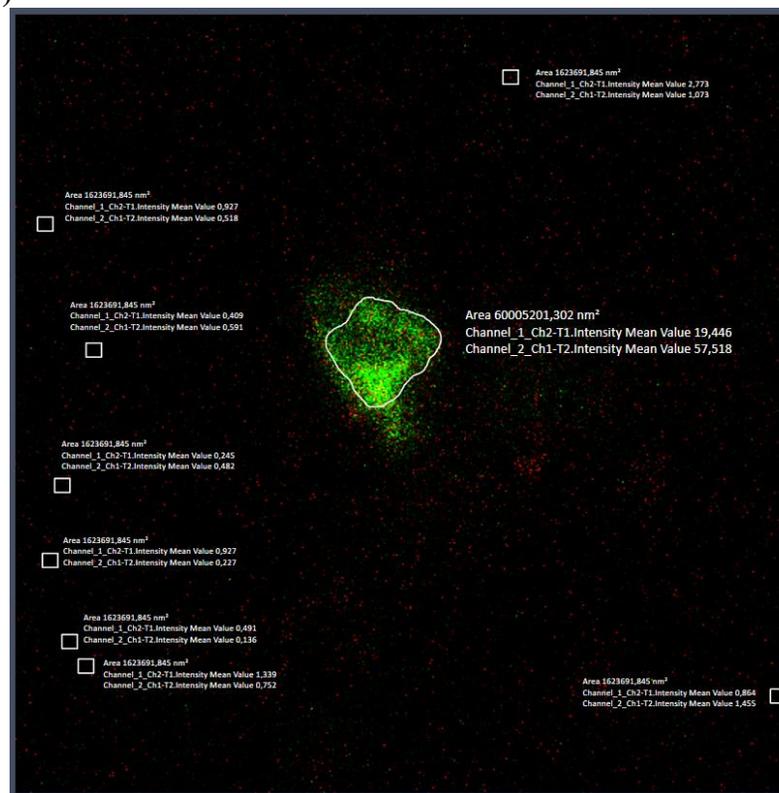


Figura A5. Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #4 y #5 y (B) #3, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

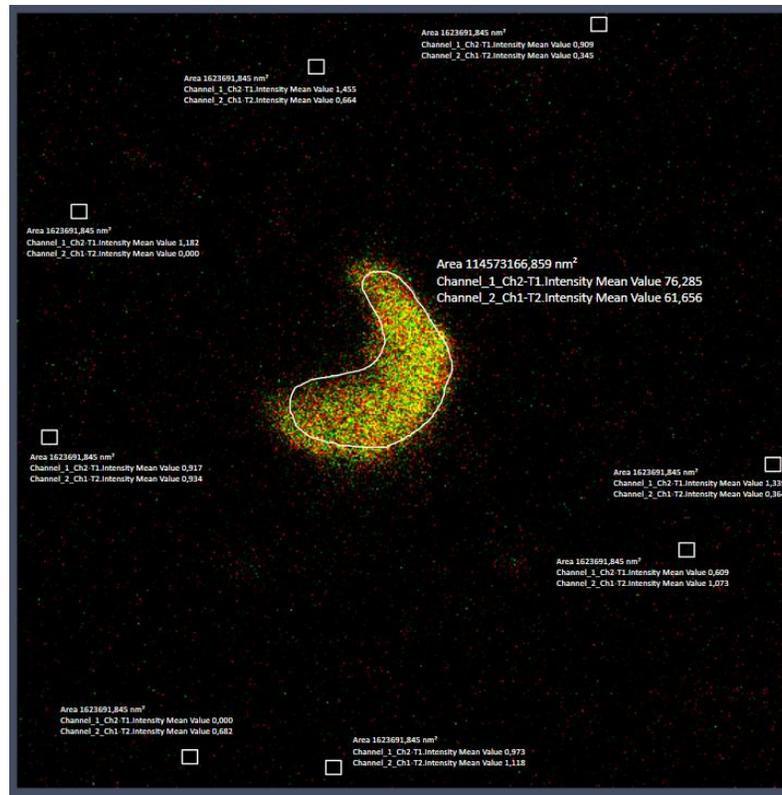
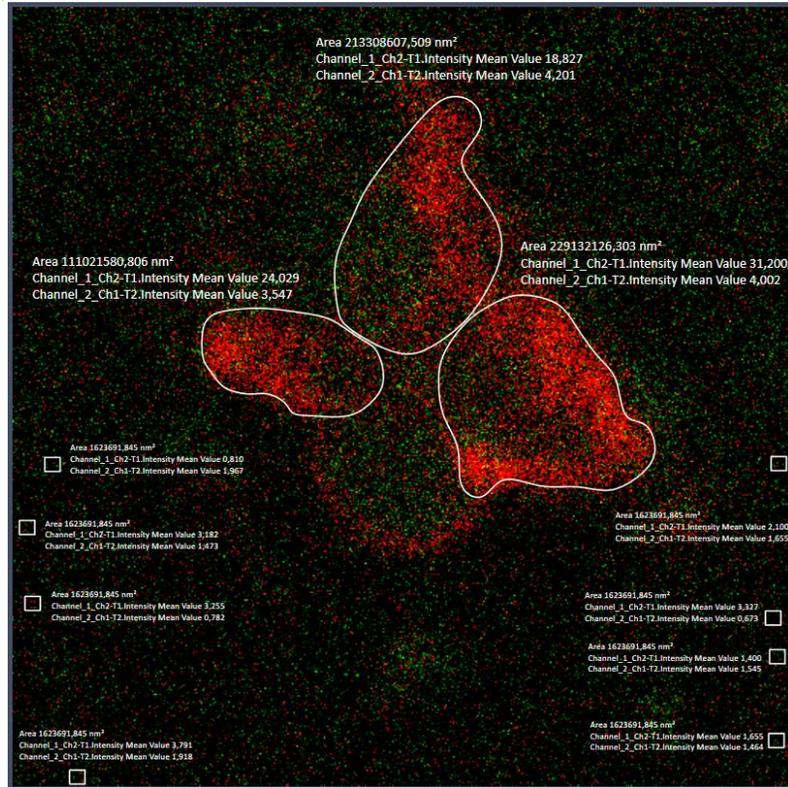


Figura A6. Selección del área correspondiente a la célula Caco-2 #7, analizada cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

C.3 Selección de las áreas correspondientes a las células Caco-2 analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM, y del background del inserto

(A)



(B)

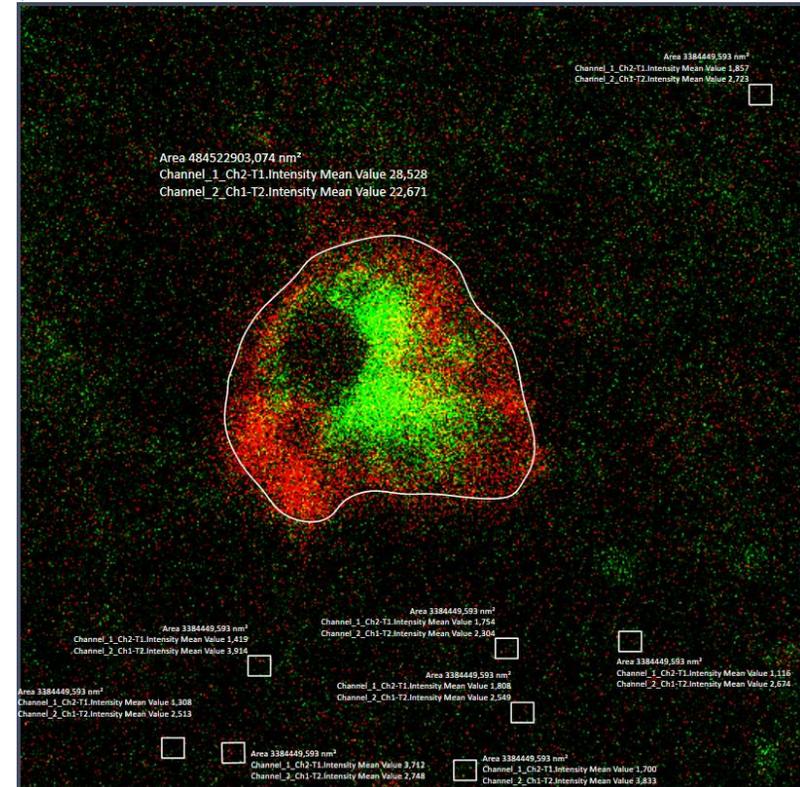


Figura A7. Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #1, #2 y #3 y (B) #4, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

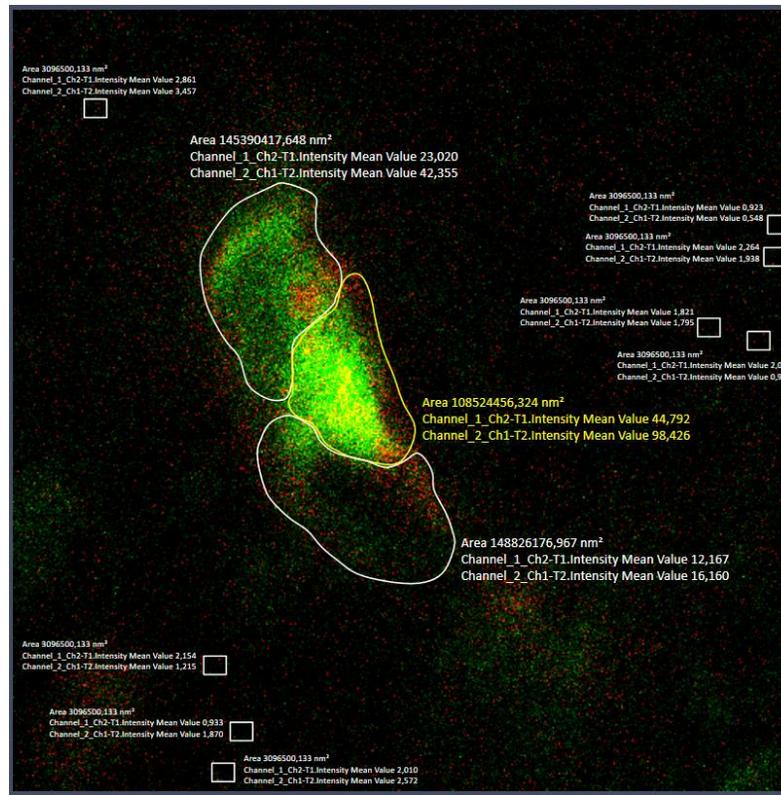
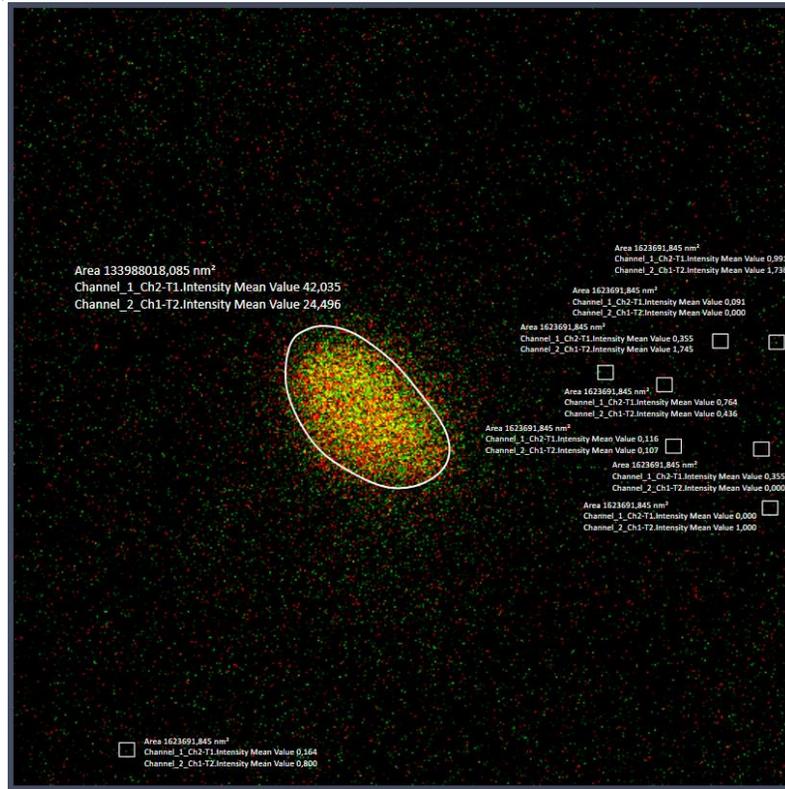


Figura A8. Selección del área correspondiente a la célula Caco-2 #5, #6 y #7, analizada cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

C.4 Selección de las áreas correspondientes a las células Caco-2 analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μ M junto con 10 μ M de FAS, y del background del inserto

(A)



(B)

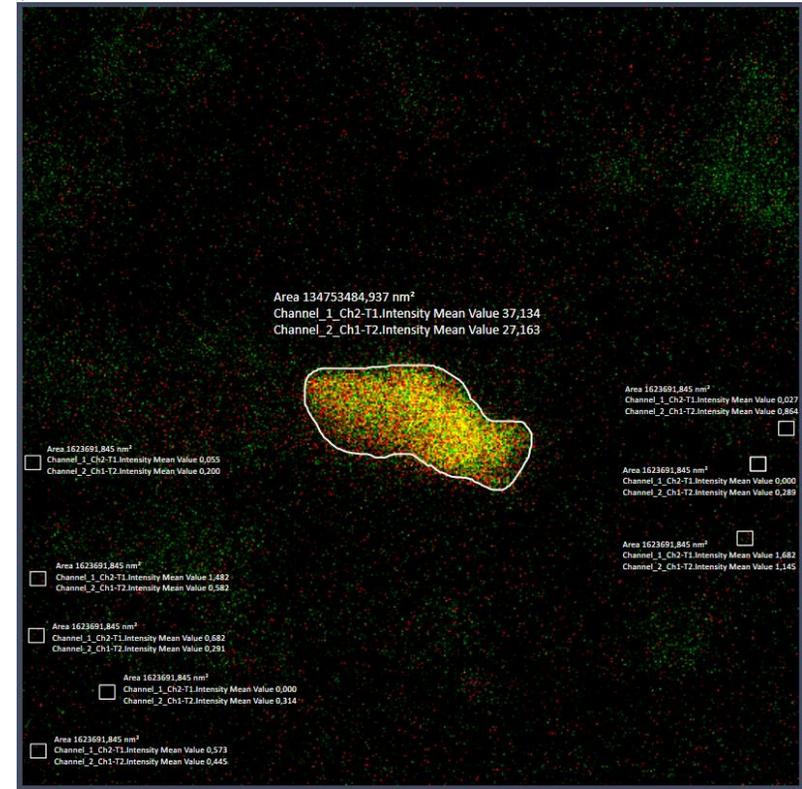
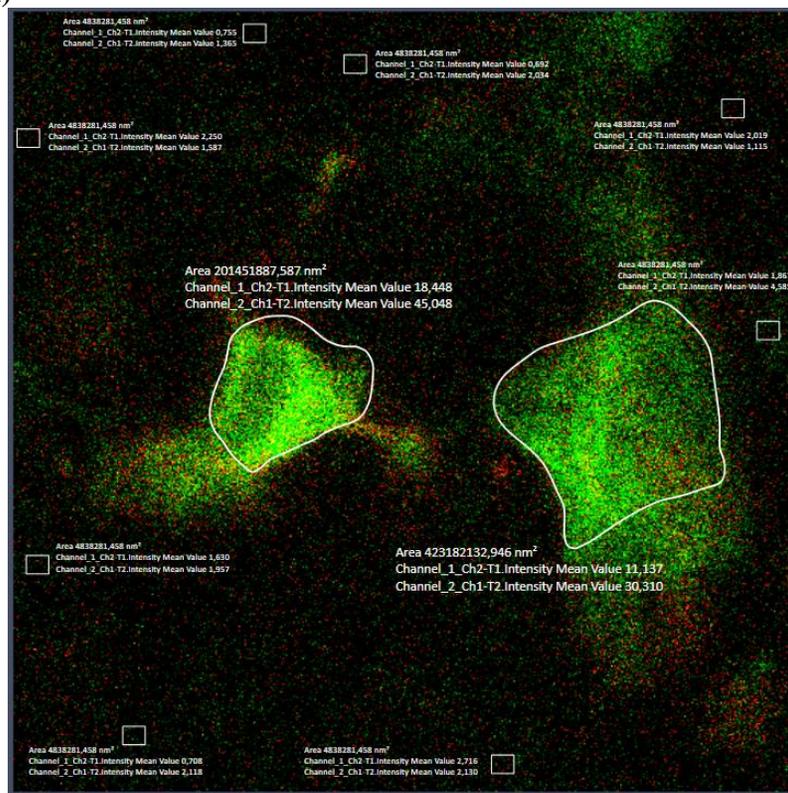


Figura A9. Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #1 y (B) #2, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μ M junto con 10 μ M de FAS, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

(A)



(B)

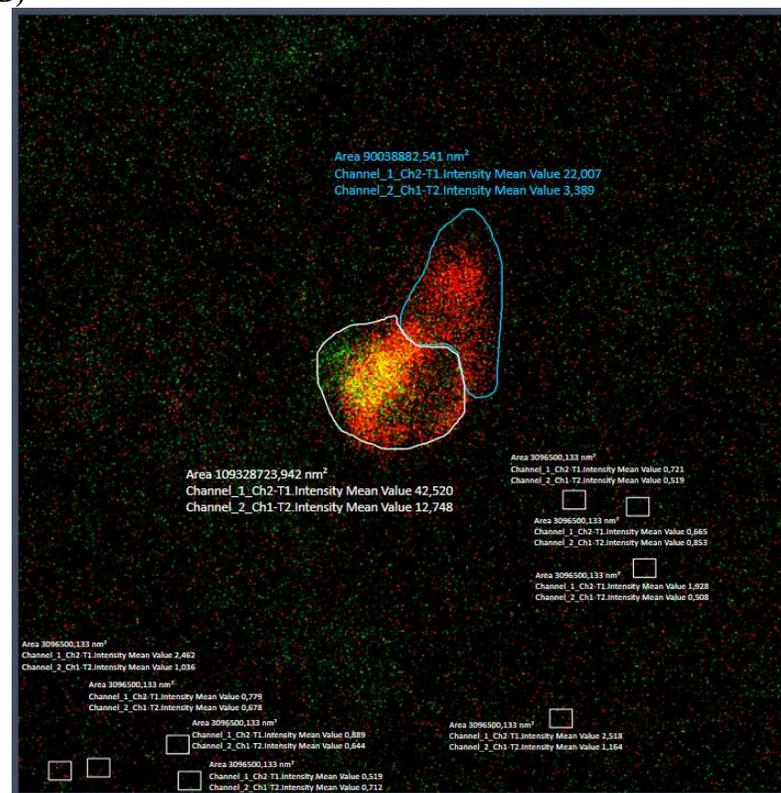
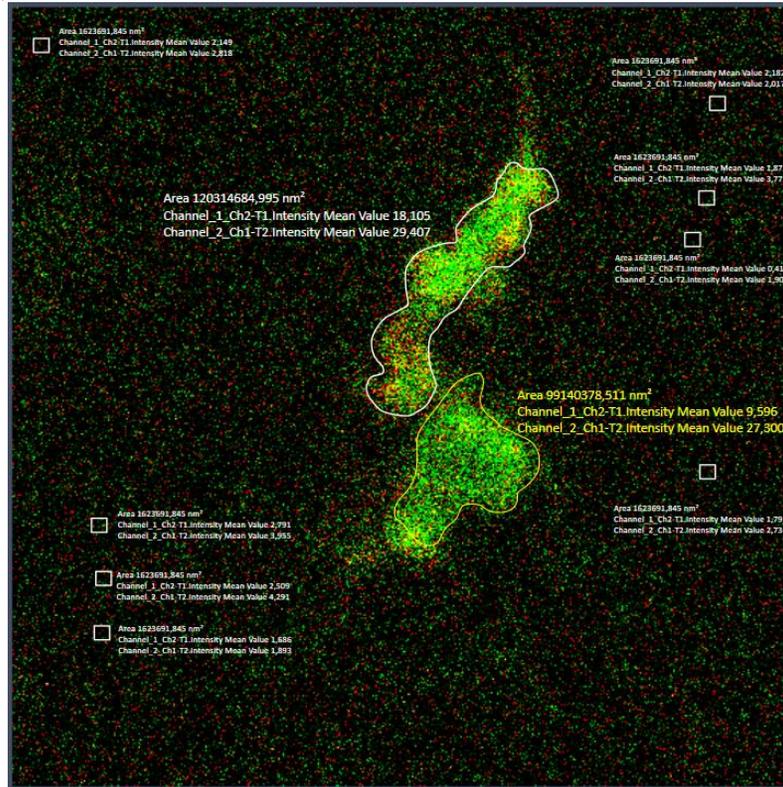


Figura A10. Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #3 y #4 y (B) #5 y #6, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μ M junto con 10 μ M de FAS, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

C.5 Selección de las áreas correspondientes a las células Caco-2 analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM junto con 10 μ M de FAS, y del background del inserto

(A)



(B)

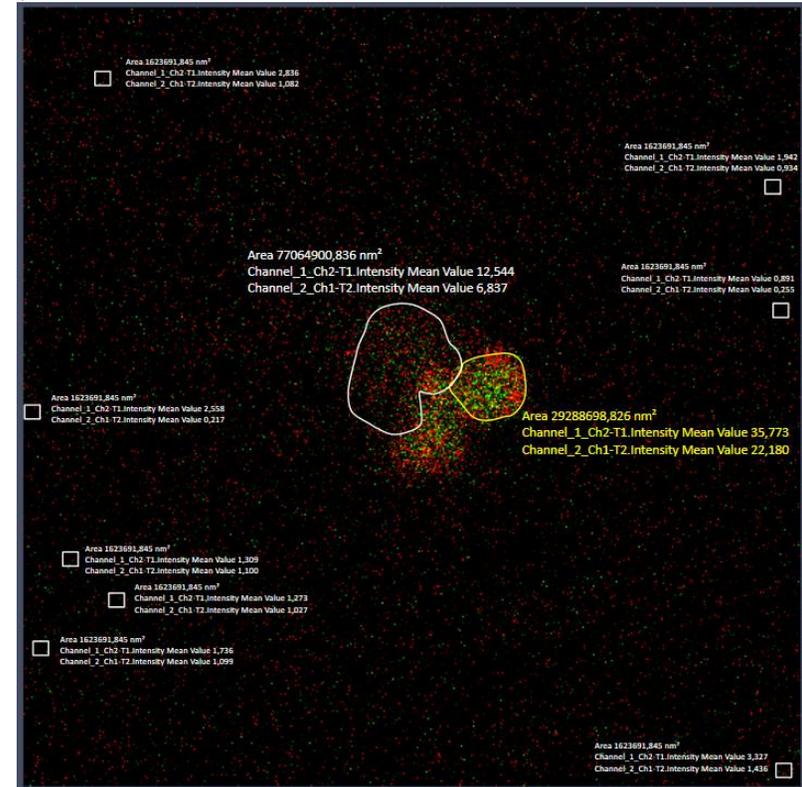
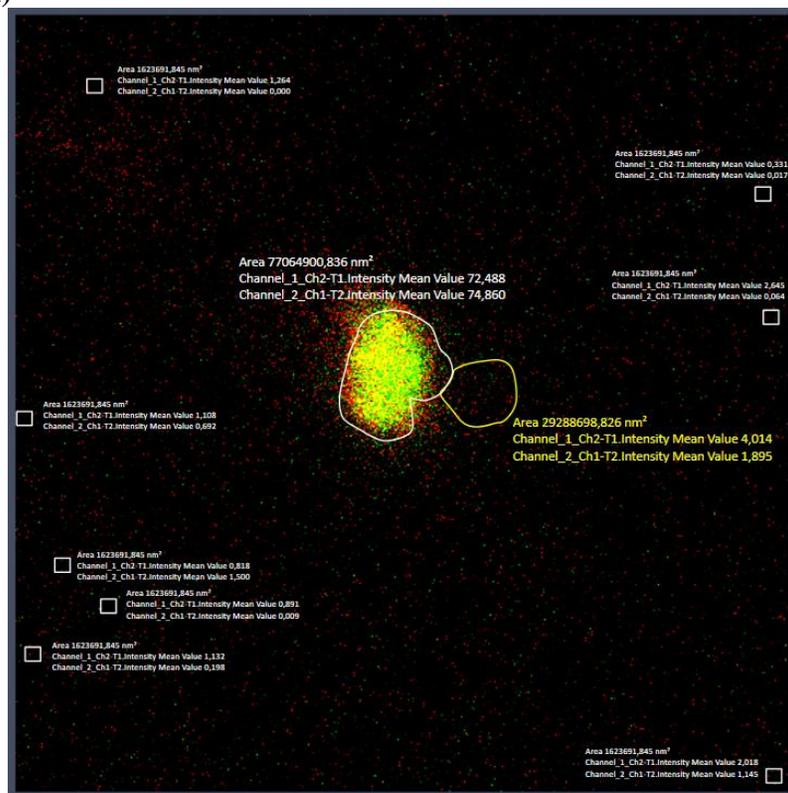


Figura A11. Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #1 y #2, y (B) #3, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM junto con 10 μ M de FAS, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

(A)



(B)

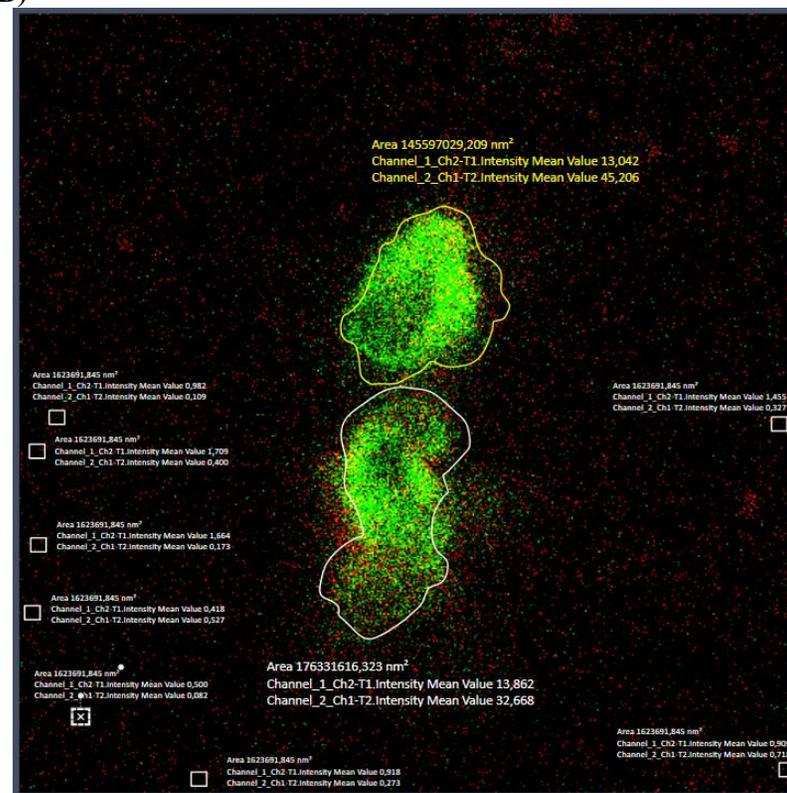
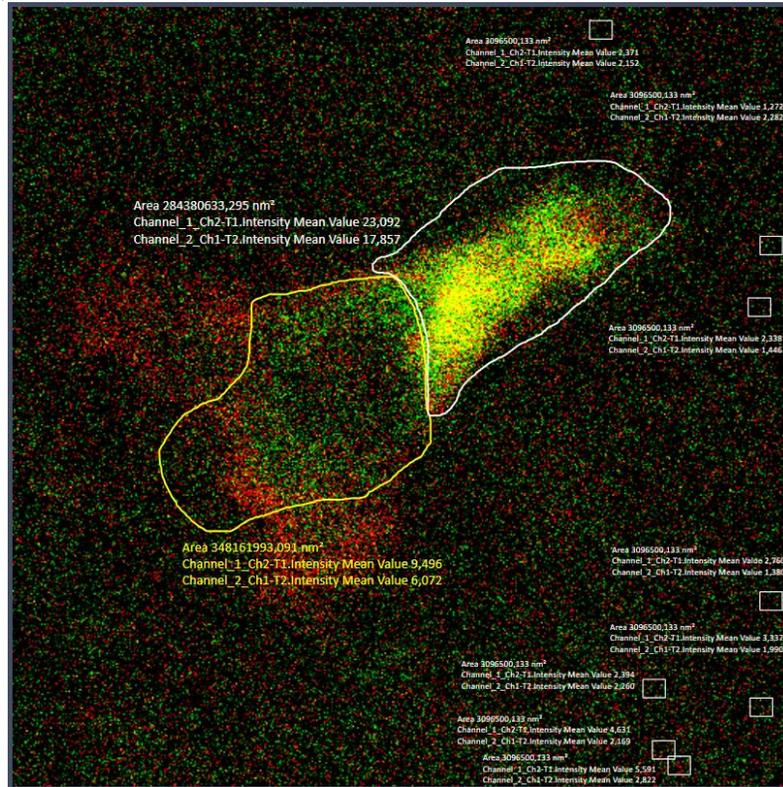


Figura A12. Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #4, y (B) #5 y #6, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM junto con 10 μ M de FAS, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

C.6 Selección de las áreas correspondientes a las células Caco-2 analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM junto con 10 μ M de FAS, y del background del inserto

(A)



(B)

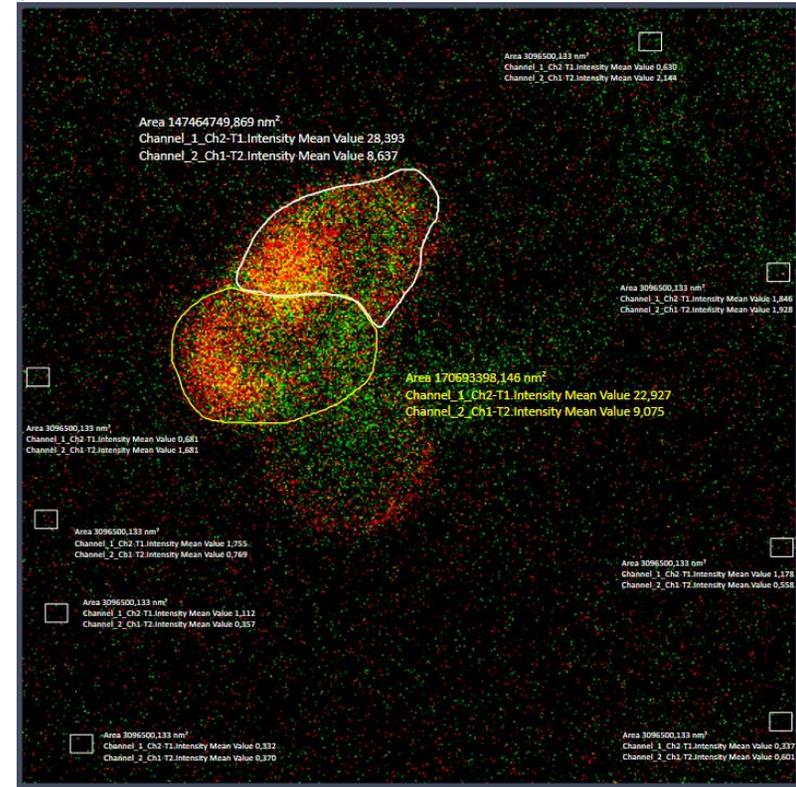
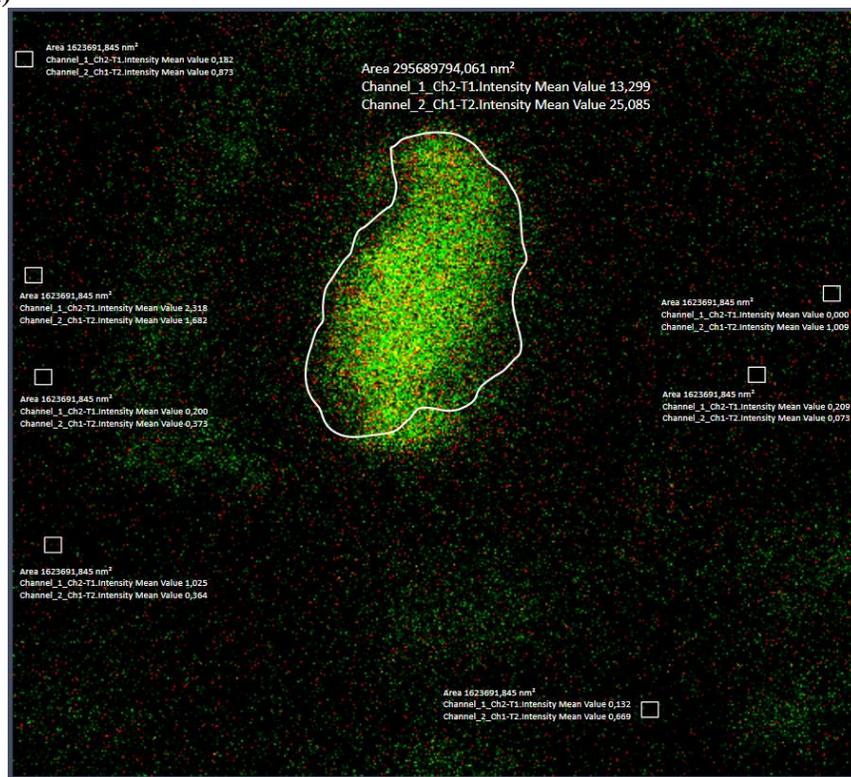


Figura A13. Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #1 y #2, y (B) #3 y #4, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM junto con 10 μ M de FAS, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

(A)



(B)

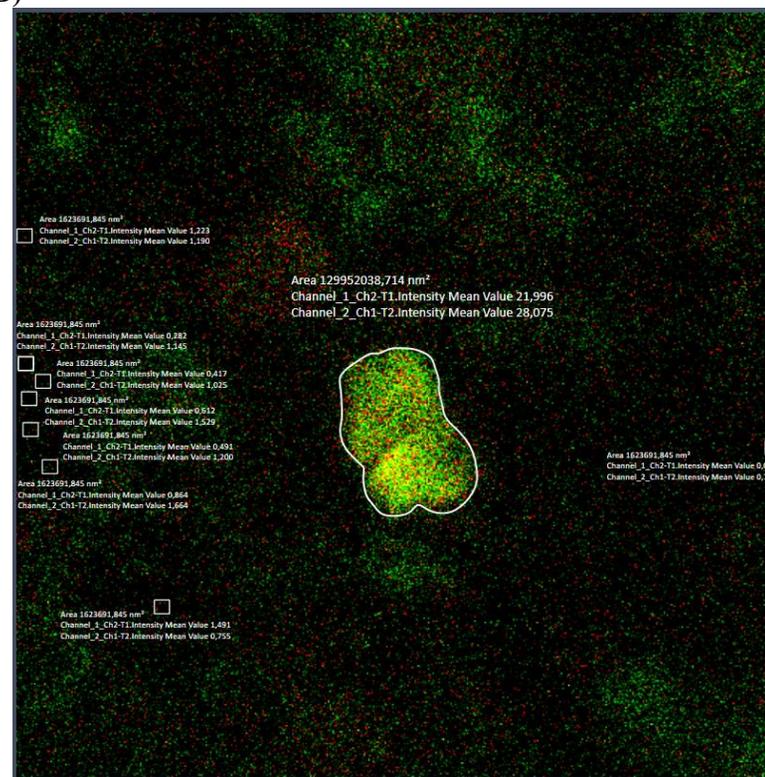


Figura A14. Selección del área correspondiente a las células Caco-2: (A) #5, y (B) #6, analizadas cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM junto con 10 μ M de FAS, y de las ocho áreas para determinar la fluorescencia base del inserto (rectángulos). La intensidad de fluorescencia etiquetada como “Channel_1_Ch2-T1” corresponde a la de FPN-TagRFP, y “Channel_2_Ch1-T1” es la fluorescencia de DMT1-EGFP. Cada imagen fue obtenida con el programa ZEN 3.2 Blue Edition, (ZEISS).

D. Mapa de los vectores utilizados

En este trabajo se utilizaron los vectores EGFP-C1 y TagRFP-C, mostrados en las Figuras A1 y A2, para la expresión del gen SLC11A2-1A/IRE(+) (DMT1-1A/IRE(+)) y del gen SLC40A1 (FPN1) respectivamente, en las células Caco-2.

DH5alpha es la cepa huésped utilizada para la propagación en *E. coli* de ambos vectores, en medio LB a 37 °C. Los vectores confieren resistencia a kanamicina (30 µg/mL) a los *hosts* de *E. coli*.

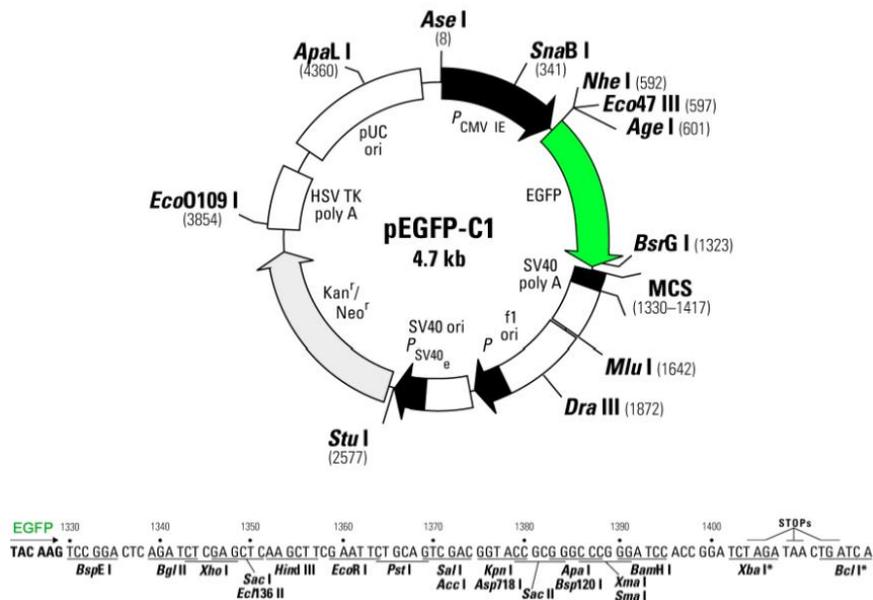


Figura A15. Mapa circular del vector de expresión pEGFP-C1. El gen SLC11A2-1A/IRE(+) se subclonó en este vector. Disponible en: <https://www.addgene.org/44225/>.

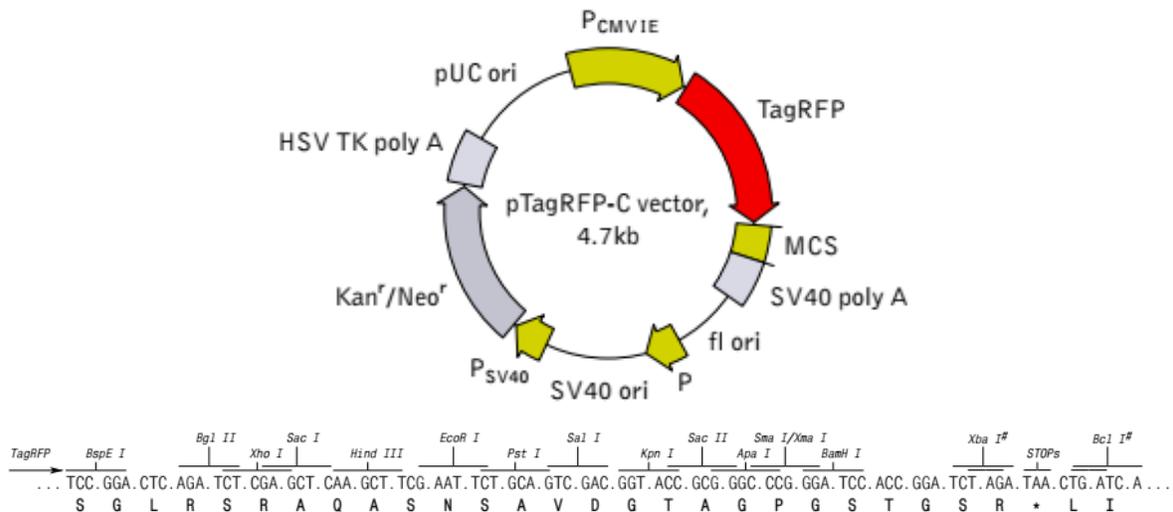


Figura A16. Mapa circular del vector de expresión pTagRFP-C. El gen SLC40A1 se subclonó en este vector. Disponible en <http://evrogen.com/products/vectors/pTagRFP-C/pTagRFP-C.shtml>.

E. Ajuste de parámetros de los modelos fenomenológicos propuestos

E.1 Ajuste de parámetros del Modelo A

Las condiciones iniciales para el *Modelo A* se establecieron como $Fe_{IN}^{2+}=0 \mu M$, $Fe_{OUT}^{2+}(0)=0$ o $10 \mu M$, $Ca_{OUT}^{2+}(0)=10 \mu M$, $1,5 mM$ o $3 mM$, $P_1(0)=0,20$, $P_5(0)=0,25$, $P_6(0)=0,20$, $P_7(0)=0,10$, $P_8(0)=0,25$ y el resto de las fracciones de DMT1 a cero.

Parámetro	Valor	Unidades
k_{12}	$7,4949 \cdot 10^{-8}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$
k_{14}	0,3944	min^{-1}
k_{41}	0,5982	min^{-1}
k_{23}	1,2167	min^{-1}
k_{34}	4,6055	min^{-1}
k_{56}	$5,8258 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}
$DMT1_E$	72452,7808	μM
k_{inCa}	$1,1508 \cdot 10^{-8}$	μM^{-1}
k_{outCa}	$8,0477 \cdot 10^{-5}$	μM^{-1}

➤ Cuando la concentración de calcio extracelular era de $10 \mu M$, con $0 \mu M$ de FAS

Parámetro	Valor	Unidades
k_{45}	8,3495	$min^{-1} \cdot \mu M^{-2}$
k_{64}	-0,1260	min^{-1}
k_{17}	$2,6343 \cdot 10^{-3}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$
k_{71}	$-5,0217 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}
k_{78}	0,3265	$[min \cdot \mu M]^{-1}$
k_{87}	0,2275	min^{-1}
$R^2 = 0,6258$		
$AIC_C = 224,2864$		

➤ Cuando la concentración de calcio extracelular era de $1,5 mM$, con $0 \mu M$ de FAS

Parámetro	Valor	Unidades
k_{45}	0,7864	$min^{-1} \cdot \mu M^{-2}$
k_{64}	$6,0192 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
k_{17}	$3,0746 \cdot 10^{-3}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$
k_{71}	$1,0696 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
k_{78}	$3,3974 \cdot 10^{-2}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$
k_{87}	$9,6606 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
$R^2 = 0,8688$		
$AIC_C = 386,0609$		

- Cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM, con 0 μM de FAS

Parámetro	Valor	Unidades
k_{45}	2,8054	$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-2}$
k_{64}	$3,9253 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
k_{17}	$7,9323 \cdot 10^{-3}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{71}	$6,2031 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}
k_{78}	$1,9522 \cdot 10^{-2}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{87}	$5,1705 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
$R^2 = 0,7601$		
$AIC_C = 244,5902$		

- Cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μM junto con 10 μM de FAS

Parámetro	Valor	Unidades
k_{45}	7,5672	$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-2}$
k_{64}	$-2,2409 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
k_{17}	$6,3751 \cdot 10^{-3}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{71}	$5,6921 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}
k_{78}	$2,9893 \cdot 10^{-2}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{87}	$1,2366 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}
$R^2 = 0,9649$		
$AIC_C = 297,3987$		

- Cuando la concentración de calcio extracelular era 1,5 mM junto con 10 μM de FAS

Parámetro	Valor	Unidades
k_{45}	0,2151	$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-2}$
k_{64}	0,4094	min^{-1}
k_{17}	$6,5393 \cdot 10^{-5}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{71}	$4,7887 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}
k_{78}	$1,8793 \cdot 10^{-2}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{87}	$1,2551 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}
$R^2 = 0,8554$		
$AIC_C = 255,8577$		

- Cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM junto con 10 μM de FAS

Parámetro	Valor	Unidades
k_{45}	0,4074	$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-2}$
k_{64}	$4,0844 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}
k_{17}	$2,5449 \cdot 10^{-3}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{71}	$7,0370 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}
k_{78}	$4,6436 \cdot 10^{-2}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{87}	$1,2636 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}
$R^2 = 0,9613$		
$AIC_C = 272,6305$		

E.2 Ajuste de parámetros del Modelo B

Las condiciones iniciales para el *Modelo B* se establecieron como $Fe_{IN}^{2+}=0 \mu M$, $Fe_{OUT}^{2+}(0)=0$ o $10 \mu M$, $Ca_{OUT}^{2+}(0)=10 \mu M$, $1,5 mM$ o $3 mM$, $P_1(0)=0,20$, $P_5(0)=0,18$, $P_6(0)=0,17$, $P_7(0)=0,10$, $P_8(0)=0,18$, $P_9(0)=0,17$ y el resto de las fracciones de DMT1 a cero.

Parámetro	Valor	Unidades
k_{12}	$1,2996 \cdot 10^{-7}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$
k_{14}	0,3781	min^{-1}
k_{41}	0,6747	min^{-1}
k_{23}	1,0832	min^{-1}
k_{34}	4,0509	min^{-1}
$DMT1_E$	73320,3441	μM
k_{71}	$4,8420 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}
k_{89}	0,1101	min^{-1}
k_{inCa}	$2,1789 \cdot 10^{-8}$	μM^{-1}
k_{outCa}	$7,1245 \cdot 10^{-5}$	μM^{-1}

➤ Cuando la concentración de calcio extracelular era de $10 \mu M$, con $0 \mu M$ de FAS

Parámetro	Valor	Unidades
k_{45}	4,1505	$min^{-1} \cdot \mu M^{-2}$
k_{56}	$1,5765 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}
k_{64}	0,7363	min^{-1}
k_{17}	$3,1479 \cdot 10^{-3}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$
k_{78}	0,3575	$[min \cdot \mu M]^{-1}$
k_{97}	0,4177	min^{-1}
$R^2 = 0,9934$		
$AIC_C = 331,7528$		

➤ Cuando la concentración de calcio extracelular era de $1,5 mM$, con $0 \mu M$ de FAS

Parámetro	Valor	Unidades
k_{45}	3,1981	$min^{-1} \cdot \mu M^{-2}$
k_{56}	$7,2695 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}
k_{64}	$1,0538 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}
k_{17}	$6,8493 \cdot 10^{-3}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$
k_{78}	0,1003	$[min \cdot \mu M]^{-1}$
k_{97}	$5,7740 \cdot 10^{-6}$	min^{-1}
$R^2 = 0,9315$		
$AIC_C = 380,5597$		

- Cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM, con 0 μM de FAS

Parámetro	Valor	Unidades
k_{45}	1,2487	$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-2}$
k_{56}	$4,7080 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}
k_{64}	$5,4291 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
k_{17}	$7,4230 \cdot 10^{-3}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{78}	$6,6983 \cdot 10^{-2}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{97}	$-8,5434 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
$R^2 = 0,7483$		
$AIC_C = 261,4007$		

- Cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μM junto con 10 μM de FAS

Parámetro	Valor	Unidades
k_{45}	37,4976	$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-2}$
k_{56}	$6,0028 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
k_{64}	$-3,1475 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
k_{17}	$7,0327 \cdot 10^{-3}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{78}	0,1276	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{97}	$8,5590 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}
$R^2 = 0,9677$		
$AIC_C = 318,9206$		

- Cuando la concentración de calcio extracelular era 1,5 mM junto con 10 μM de FAS

Parámetro	Valor	Unidades
k_{45}	0,5001	$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-2}$
k_{56}	0,3048	min^{-1}
k_{64}	1,5719	min^{-1}
k_{17}	$9,8632 \cdot 10^{-5}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{78}	$3,6696 \cdot 10^{-2}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{97}	$5,6077 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
$R^2 = 0,8595$		
$AIC_C = 274,6809$		

- Cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM junto con 10 μM de FAS

Parámetro	Valor	Unidades
k_{45}	0,2186	$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-2}$
k_{56}	$1,0048 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
k_{64}	$5,0488 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}
k_{17}	$2,9636 \cdot 10^{-4}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{78}	0,1152	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{97}	$5,6513 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
$R^2 = 0,9731$		
$AIC_C = 292,8215$		

E.3 Ajuste de parámetros del Modelo C

Las condiciones iniciales para el Modelo C se establecieron como $Fe_{IN}^{2+}=0 \mu M$, $Fe_{OUT}^{2+}(0)=0$ o $10 \mu M$, $Ca_{OUT}^{2+}(0)=10 \mu M$, $1,5 mM$ o $3 mM$, $P_1(0)=0,22$, $P_5(0)=0,20$, $P_6(0)=0,10$, $P_7(0)=0,08$, $P_8(0)=0,25$, $P_9(0)=0,15$ y el resto de las fracciones de DMT1 a cero.

Parámetro	Valor	Unidades	Intervalo de Confianza ($\alpha = 0,05$)
k_{12}	$1,0254 \cdot 10^{-7}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$	$\pm 2,3212 \cdot 10^{-9}$
k_{14}	0,5164	min^{-1}	$\pm 1,8422 \cdot 10^{-2}$
k_{41}	0,6642	min^{-1}	$\pm 2,0583 \cdot 10^{-2}$
k_{23}	1,1341	min^{-1}	$\pm 0,1573$
k_{34}	4,2381	min^{-1}	$\pm 0,2465$
$DMT1_E$	68977,6307	μM	$\pm 8324,3560$
k_{71}	$7,0015 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}	$\pm 1,2349 \cdot 10^{-5}$
k_{89}	0,1051	min^{-1}	$\pm 1,1498 \cdot 10^{-2}$
k_{710}	$8,0509 \cdot 10^{-7}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$	$\pm 1,0494 \cdot 10^{-8}$
k_{210}	$7,4995 \cdot 10^{-5}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$	$\pm 4,0756 \cdot 10^{-6}$
k_{102}	$6,8353 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}	$\pm 5,1712 \cdot 10^{-5}$
k_{inCa}	$1,2854 \cdot 10^{-8}$	μM^{-1}	$\pm 1,8553 \cdot 10^{-9}$
k_{outCa}	$6,8520 \cdot 10^{-5}$	μM^{-1}	$\pm 1,5227 \cdot 10^{-6}$

➤ Cuando la concentración de calcio extracelular era de $10 \mu M$, con $0 \mu M$ de FAS

Parámetro	Valor	Unidades	Intervalo de Confianza ($\alpha = 0,05$)
k_{45}	3,6261	$min^{-1} \cdot \mu M^{-2}$	$\pm 0,1184$
k_{56}	$4,1744 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}	$\pm 1,5717 \cdot 10^{-5}$
k_{64}	0,4425	min^{-1}	$\pm 3,4299 \cdot 10^{-2}$
k_{17}	$2,6903 \cdot 10^{-3}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$	$\pm 1,5358 \cdot 10^{-4}$
k_{78}	0,3321	$[min \cdot \mu M]^{-1}$	$\pm 2,0204 \cdot 10^{-2}$
k_{97}	0,9138	min^{-1}	$\pm 3,4848 \cdot 10^{-2}$
$R^2_{Entrenamiento} = 0,9950$; $R^2_{validación} = 0,9833$ $MSE_{jk} = 0,0651$ $AIC_C_{Entrenamiento} = 336,7112$; $AIC_C_{validación} = 307,0826$			

➤ Cuando la concentración de calcio extracelular era de $1,5 mM$, con $0 \mu M$ de FAS

Parámetro	Valor	Unidades	Intervalo de Confianza ($\alpha = 0,05$)
k_{45}	0,4257	$min^{-1} \cdot \mu M^{-2}$	$\pm 1,1906 \cdot 10^{-2}$
k_{56}	$3,5904 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}	$\pm 5,1105 \cdot 10^{-5}$
k_{64}	$8,3648 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}	$\pm 1,6867 \cdot 10^{-4}$
k_{17}	$1,8527 \cdot 10^{-2}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$	$\pm 1,2944 \cdot 10^{-3}$
k_{78}	$8,7120 \cdot 10^{-2}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$	$\pm 7,6782 \cdot 10^{-4}$
k_{97}	$1,6206 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}	$\pm 5,6475 \cdot 10^{-4}$
$R^2_{Entrenamiento} = 0,9721$; $R^2_{validación} = 0,9728$ $MSE_{jk} = 0,1171$ $AIC_C_{Entrenamiento} = 411,7857$; $AIC_C_{validación} = 333,5564$			

➤ Cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM, con 0 μM de FAS

Parámetro	Valor	Unidades	Intervalo de Confianza ($\alpha = 0,05$)
k_{45}	1,3837	$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-2}$	$\pm 0,1179$
k_{56}	$4,0985 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}	$\pm 1,0623 \cdot 10^{-5}$
k_{64}	$5,8446 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}	$\pm 7,5017 \cdot 10^{-6}$
k_{17}	$1,4712 \cdot 10^{-2}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$	$\pm 1,7587 \cdot 10^{-4}$
k_{78}	$6,2167 \cdot 10^{-2}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$	$\pm 5,6891 \cdot 10^{-4}$
k_{97}	$1,3141 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}	$\pm 2,3088 \cdot 10^{-4}$
$R^2_{\text{Entrenamiento}} = 0,7393$; $R^2_{\text{Validación}} = 0,7151$ $MSE_{jk} = 0,1898$ $AIC_C_{\text{Entrenamiento}} = 255,8483$; $AIC_C_{\text{Validación}} = 246,7687$			

➤ Cuando la concentración de calcio extracelular era de 10 μM, con 10 μM de FAS

Parámetro	Valor	Unidades	Intervalo de Confianza ($\alpha = 0,05$)
k_{45}	7,2358	$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-2}$	$\pm 0,3189$
k_{56}	$4,2083 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}	$\pm 4,3356 \cdot 10^{-5}$
k_{64}	$1,5697 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}	$\pm 6,6194 \cdot 10^{-4}$
k_{17}	$1,9835 \cdot 10^{-2}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$	$\pm 2,0670 \cdot 10^{-3}$
k_{78}	0,1056	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$	$\pm 1,3388 \cdot 10^{-3}$
k_{97}	$9,0489 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}	$\pm 1,6764 \cdot 10^{-3}$
$R^2_{\text{Entrenamiento}} = 0,9788$; $R^2_{\text{Validación}} = 0,9454$ $MSE_{jk} = 0,1346$ $AIC_C_{\text{Entrenamiento}} = 330,6617$; $AIC_C_{\text{Validación}} = 419,0723$			

➤ Cuando la concentración de calcio extracelular era de 1,5 mM, con 10 μM de FAS

Parámetro	Valor	Unidades	Intervalo de Confianza ($\alpha = 0,05$)
k_{45}	11,8899	$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-2}$	$\pm 9,9604 \cdot 10^{-3}$
k_{56}	1,3570	min^{-1}	$\pm 2,8239 \cdot 10^{-2}$
k_{64}	1,9321	min^{-1}	$\pm 0,1161$
k_{17}	$6,1953 \cdot 10^{-4}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$	$\pm 9,1282 \cdot 10^{-6}$
k_{78}	$7,2553 \cdot 10^{-2}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$	$\pm 3,5333 \cdot 10^{-3}$
k_{97}	$1,5578 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}	$\pm 1,1365 \cdot 10^{-5}$
$R^2_{\text{Entrenamiento}} = 0,9088$; $R^2_{\text{Validación}} = 0,9413$ $MSE_{jk} = 0,1435$ $AIC_C_{\text{Entrenamiento}} = 300,1082$; $AIC_C_{\text{Validación}} = 295,8849$			

➤ Cuando la concentración de calcio extracelular era de 3 mM, con 10 μM de FAS

Parámetro	Valor	Unidades	Intervalo de Confianza ($\alpha = 0,05$)
k_{45}	$1,1193 \cdot 10^{-1}$	$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-2}$	$\pm 4,5828 \cdot 10^{-3}$
k_{56}	$4,0016 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}	$\pm 1,4698 \cdot 10^{-5}$
k_{64}	$2,6498 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}	$\pm 6,1357 \cdot 10^{-4}$
k_{17}	$6,8873 \cdot 10^{-4}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$	$\pm 4,1224 \cdot 10^{-6}$
k_{78}	$9,2274 \cdot 10^{-2}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$	$\pm 2,3589 \cdot 10^{-3}$
k_{97}	$3,4544 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}	$\pm 1,3797 \cdot 10^{-4}$
$R_{\text{Entrenamiento}}^2 = 0,9900$; $R_{\text{Validación}}^2 = 0,9847$ $MSE_{jk} = 0,0517$ $AIC_C \text{ Entrenamiento} = 305,6623$; $AIC_C \text{ Validación} = 396,7722$			

E.4 Ajuste de parámetros del modelo C modificado para el caso en el que las concentraciones de calcio y de hierro en el medio apical eran de 3mM y 0 μM respectivamente

➤ Cuando la concentración de calcio extracelular era de 3mM, con 0 μM de FAS

Parámetro	Valor	Unidades
k_{12}	$9,6541 \cdot 10^{-8}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{14}	$4,9560 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}
k_{41}	0,6366	min^{-1}
k_{23}	0,7525	min^{-1}
k_{34}	4,8986	min^{-1}
k_{45}	1,7284	$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-2}$
k_{56}	$5,7536 \cdot 10^{-4}$	min^{-1}
k_{64}	$3,9734 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
$DMT1_E$	84381,9932	μM
k_{17}	$3,0517 \cdot 10^{-5}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{71}	$8,3991 \cdot 10^{-5}$	min^{-1}
k_{78}	1,6091	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{97}	$9,3051 \cdot 10^{-2}$	min^{-1}
k_{89}	0,6826	min^{-1}
k_{710}	$6,5009 \cdot 10^{-7}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{210}	$6,0787 \cdot 10^{-5}$	$[\text{min} \cdot \mu\text{M}]^{-1}$
k_{102}	$1,0481 \cdot 10^{-3}$	min^{-1}
k_{Ca}	$1,4661 \cdot 10^{-4}$	μM^{-1}
$R_{\text{Entrenamiento}}^2 = 0,9523$; $R_{\text{Validación}}^2 = 0,8160$ $MSE_{jk} = 0,1223$ $AIC_C \text{ Entrenamiento} = 235,4622$; $AIC_C \text{ Validación} = 242,6181$		

Glosario

A

- ABCG2: proteína G2 del casete de unión al ATP
- AIC: criterio de información de Akaike
- AICc: criterio de información de Akaike corregido por sesgo
- apo-Tf: transferrina no unida al hierro

B

- BAPTA: Ácido 1,2-bis(2-aminofenoxy)etano-N,N,N',N'-tetraacético (*1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid*). Quelante altamente selectivo de las reservas intracelulares de Ca^{2+}
- BBM: membrana de ribete de cepillo
- BLM: membrana basolateral

C

- Caco-2: línea celular de carcinoma de colon humano
- CCM: citrato-malato de calcio
- cLIP: grupo de hierro lábil citosólico

D

- DcytB: citocromo B duodenal
- DFO: desferrioxamina
- DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DMT1: Transportador de Metal Divalente 1

E

- EDTA: Ácido etilendiaminatetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EGTA: Ácido Tetraacético de Etilenglicol (*ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*)

F

- FAS: sulfato de amonio ferroso
- Fe-Asc: ascorbato ferroso
- Fe^{2+} : hierro ferroso
- Fe^{3+} : hierro férrico
- FLVCR: receptor del subgrupo C del virus de la leucemia felina
- FPN: Ferroportina, también denominada como IREG1 (*Iron Regulated Gene 1*), SLC40A1 o MTP1
- FPN1A: isoforma 1A de ferroportina- Contiene un elemento de respuesta al hierro (IRE) en la región no codificante 5'
- FPN1B: isoforma 1B de ferroportina. Carece de un elemento de respuesta al hierro (IRE) en la región no codificante 5'

H

- HCP1: Proteína Transportadora Hemo 1
- hDMT1: Transportador de Metal Divalente 1 humano
- HEK: células embrionarias de riñón humano
- holo-Tf: transferrina unida a dos iones de hierro
- HO1-CytP450: complejo multienzimático hemooxigenasa citosólica-1/NADPH-Citocromo P450 reductasa
- Hp: hefaestina
- HREs: elementos de respuesta a la hipoxia

I

- IC: intervalos de confianza
- IDA: anemia por deficiencia de hierro
- IMDM: medio Dulbecco modificado de Iscove (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*)
- IRE: elemento sensible al hierro
- IRP: proteínas reguladoras del hierro

L

- LB: Medio Luria-Bertani
- LOOCV: técnica de validación cruzada dejando uno fuera o Jackknife (*leave-one-out cross-validation*)

M

- MEM: Medio Esencial Mínimo (*Minimum Essential Media*)
- MSE: error cuadrático medio (*Mean Square Error*)
- MSE_{jk}: MSE de *Jackknife*

N

- NCX1: intercambiador de Na⁺/Ca²⁺
- NTBI: hierro no unido a transferrina

O

- Opti-MEM® I: Medio Esencial Mínimo mejorado. Permite una reducción de la suplementación de SBF

P

- PBS: tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (*phosphate buffered saline*)
- PMCA1b: Ca²⁺-ATPasa 1b de la membrana plasmática

T

- TEER: resistencia eléctrica transepitelial
- Tf: transferrina
- TAP: tapsigargina, inhibidor altamente selectivo de la Ca²⁺-ATPasa del retículo sarcoendoplásmico
- TRPV6: canal de cationes de potencial receptor transitorio, miembro de la familia vaniloide 6

R

- RTf: receptores específicos de transferrina

S

- SBF: suero bovino fetal (*fetal bovine-serum*)
- scDMT: transportador de metal divalente de ostiones

V

- VDR: receptor intestinal de vitamina D