

Tesis Doctoral

Estudio de los mecanismos subyacentes al control del metabolismo del hemo en un modelo de diabetes experimental

Oliveri, Leda María

2017

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Oliveri, Leda María. (2017). Estudio de los mecanismos subyacentes al control del metabolismo del hemo en un modelo de diabetes experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6431_Oliveri

Cita tipo Chicago:

Oliveri, Leda María. "Estudio de los mecanismos subyacentes al control del metabolismo del hemo en un modelo de diabetes experimental". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6431_Oliveri

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Estudio de los mecanismos subyacentes al control del metabolismo del hemo en un modelo de diabetes experimental

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Leda María Oliveri

Directores de Tesis: Dra. Alcira M. del C. Batlle
 Dra. Esther N. Gerez

Consejero de Estudios: Dra. Silvia Moreno

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) -
 CONICET - Hospital de Clínicas José de San Martín - UBA

Buenos Aires, 2017

Resumen

Estudio de los mecanismos subyacentes al control del metabolismo del hemo en un modelo de diabetes experimental

El objetivo principal de esta tesis fue avanzar en el esclarecimiento del “efecto glucosa” sobre la regulación de la biosíntesis del hemo con el propósito de elaborar nuevas y/o más eficaces terapias para el manejo de las crisis de las porfirias agudas (PAs). Con este fin se generó un modelo murino de diabetes *mellitus* tipo 1 y se utilizó el vanadato (V) como un agente insulino-mimético.

Ratones machos CF1 fueron diabetizados con una única dosis de estreptozotocina (STZ 170 mg/kg peso) y recibieron V (0,2 mg/ml) en el agua de bebida. El estudio se prolongó 32 días a partir de la inyección de STZ. Se estudió la expresión de los ARNm de la delta aminolevulinato sintetasa (ALA-S1) y de la ferroquelatasa (FQ) así como los niveles de sus proteínas y de las proteínas participantes en la vía PI3K/Akt.

En los animales diabéticos a los 32 días de inyectados con STZ el ARNm y la proteína del ALA-S1 aumentaron observándose también una caída en la fosforilación de Akt y un incremento en la formación del complejo nuclear FOXO-PGC-1 α . El vanadato revirtió este efecto a través de la activación de la vía PI3K/Akt reduciendo los niveles nucleares de dicho complejo.

A los 32 días de inyectados con STZ el estado diabético produjo un aumento en el ARNm de la FQ que no fue acompañado por un incremento en los niveles de su proteína mientras que el vanadato provocó una caída en ambos parámetros. La inducción del ARNm de la FQ se debió a un incremento en la O-Glicosilación de Sp1 mientras que el vanadato revirtió este efecto.

De acuerdo con estos resultados, la FQ es un segundo punto de control de la vía biosintética del hemo y el V es un posible agente terapéutico para los ataques de PAs.

Palabras Claves: diabetes, STZ, vanadato, hemo, delta aminolevulinato sintetasa-1 (ALA-S1), ferroquelatasa (FQ), FOXO, Sp1.

Abstract

Study of the mechanisms underlying the control of heme metabolism in a model of experimental diabetes

The main objective of this thesis was to advance in the elucidation of the "glucose effect" on the regulation of heme biosynthesis, to develop a new and/or more effective therapie/s for the management of the acute porphyria (AP). To this end a murine model of diabetes *mellitus* type 1 was developed and vanadate (V) was used as an insulin-mimetic agent.

CF1 male mice were render diabetics with a single dose of streptozotocin (STZ) (170 mg/kg weight) and received V (0,2 mg/ml) in the drinking water. The study lasted 32 days after STZ injection. The expression of delta aminolevulinate synthetase-1 (ALA-S1) and ferrochelatase (FQ) mRNAs and their protein levels were studied as well as the level of proteins of the PI3K/Akt pathway.

At day 32 of injection with STZ, ALA-S1 mRNA and protein levels were induced with a fall in Akt phosphorylation concomitant with an increase in the formation of the nuclear FOXO-PGC-1 α complex. V reversed this effect through activation of PI3K/Akt pathway reducing nuclear levels of this complex.

Diabetic status increased FQ mRNA which was not accompanied by an enhancement in its protein levels, while V provoked a fall in both parameters. FQ mRNA induction was due to an increase in the O-Glycosylation of Sp1, while V reversed this effect.

According to these results, the FQ is a second control point of the heme biosynthetic pathway and V is a potential therapeutic agent for APs attacks.

Keywords: diabetes, STZ, vanadate, heme, delta aminolevulinate synthase-1 (ALA-S1), ferrochelatase (FQ), FOXO, Sp1.

Quiero agradecer a un grupo de personas que me acompañaron en este viaje que llegó a su fin. Sin ellos no hubiera sido lo mismo.

A la Dra. Alcira Batlle que me aceptó como su doctorando y me permitió realizar mi trabajo en el Centro de Porfirinas y Porfirias (CIPYP). Por su intermedio inicié mi carrera de Personal de Apoyo al Investigador del CONICET que me posibilitó continuar trabajando en el ámbito de la investigación científica.

A la Dra. Esther Gerez por su inmensa generosidad. Por compartir sus conocimientos conmigo y guiarme en este camino. Por confiar en mi capacidad de llevar a delante este proyecto y darme la oportunidad de realizar esta Tesis. Por todos estos años de trabajo compartidos codo con codo que me permitieron crecer como persona y profesional y por nuestras cacerías de patos con misiles. Y en lo personal por su amistad incondicional.

Al Dr. Roberto Meiss por su participación en este trabajo, sus consejos, sus charlas y su gran amabilidad.

Al Dr. Carlos Davio por compartir su invaluable experiencia y conocimiento y por los múltiples aportes a esta Tesis.

Al Dr. Jorge Rodriguez por sus comentarios y críticas de los resultados que no sólo han sido acertados sino que también me permitieron avanzar en la redacción de este trabajo y por su infinita paciencia.

A mis padres por estar siempre a mi lado y apoyar mis decisiones, algunas equivocadas. Sin ellos todo hubiera sido imposible.

A mi Padre

“.....pero no puedo dejar de decirte que te extrañamos mucho. Sabemos que nadie es imprescindible hasta que el sentimiento por ese nadie nos lo hace necesitar...”

Las Timoteas- E.E.O.

INDICE

Abreviaturas	1
INTRODUCCIÓN	3
Capítulo 1. Metabolismo del hemo-Porfirias	4
1.1. Hemo	4
1.2. Biosíntesis del hemo	5
1.3. Porfirias	8
1.3.1. Porfirias agudas	8
1.3.1.1. Tratamiento del ataque agudo	10
1.4. Porfirias agudas y “efecto glucosa”	11
1.5. Bibliografía	13
Capítulo 2. Metabolismo del vanadio	15
2.1. Vanadio	15
2.2. Absorción, distribución y excreción	15
2.3. Toxicidad sistémica del vanadio	16
2.4. Efecto del vanadato sobre la vía de acción de la insulina	17
2.4.1. Cascada de señalización de la insulina	17
2.4.2. Vanadio: agente insulino-mimético	18
2.5. Vanadato y tirosina quinasas citosólicas independientes del receptor de insulina	20
2.6. Bibliografía	22
Capítulo 3. Delta-aminolevulinato sintetasa	24
3.1. Descripción general	24
3.2. Control de la transcripción del gen del ALA-S1	25
3.2.1. Modulación de la expresión por FOXO-PGC1α	28
3.2.2. Modulación de la expresión por CREB	30
3.2.3. Control de la transcripción por Erk1/2	31
3.3. Bibliografía	33

Capítulo 4. Ferroquelatasa	35
4.1. Descripción general	35
4.2. Ferroquelatasa-Promotor	36
4.2.1. Factor de transcripción Sp1	36
4.3. Ferroquelatasa-Clúster de hierro-azufre	37
4.4. Bibliografía	39
OBJETIVOS	41
Objetivo general	42
Objetivos particulares	42
MATERIALES Y MÉTODOS	43
Capítulo 1. Materiales	44
1.1. Equipos	44
1.2. Reactivos	44
1.3. Sondas	45
1.4. Anticuerpos	45
Capítulo 2. Diseño experimental	46
2.1. Animales	46
2.2. Tratamientos	46
Capítulo 3. Determinaciones bioquímicas	47
3.1. Determinación de ALA y PBG urinarios	47
3.1.1. Recolección de la muestra de orina	47
3.1.2. Separación de ALA y PBG	47
3.1.3. Determinación colorimétrica de ALA y PBG	47
3.2. Cuantificación de glucosa	49
3.3. Cuantificación de insulina	49
3.4. Determinación de la concentración de proteínas	49
3.5. Cuantificación de AMPc	50

3.6. Análisis estadístico	50
3.7. Bibliografía	51
Capítulo 4. Técnicas de biología molecular	52
4.1. Determinación de la vida media del ARNm del ALA-S	52
4.2. Extracción del ARN total	52
4.3. Cuantificación de los ácidos nucleicos	53
4.4. Obtención del ADNc de las sondas	53
4.4.1. Preparación de las células competentes	53
4.4.2. Transformación de las células competentes	53
4.4.3. Separación del plásmido	54
4.4.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	54
4.4.5. Aislamiento de la sonda inserta en el plásmido	54
4.4.6. Preparación de la sonda radioactiva	55
4.5. Northern blot	55
4.5.1. Electroforesis de ARN en geles de agarosa	55
4.5.2. Transferencia de ARN a membranas de nylon	55
4.5.3. Hibridización	56
4.5.4. Exposición radiográfica	57
4.5.5. Cuantificación de las señales de hibridización	57
4.6. Western blot	57
4.6.1. Preparación homogenatos	57
4.6.1.1. Homogenato total	57
4.6.1.2. Homogenato núcleos	57
4.6.2. SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	58
4.6.3. Transferencia	58
4.6.4. Inmunodetección	58
4.6.5. Cuantificación	59
4.7. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	60
4.7.1. Cross-linkado	60
4.7.2. Inmunoprecipitación	60
4.7.3. Purificación del ADN	61

4.7.4. Bloqueo de las beads de agarosa para inmunoprecipitación	62
4.7.5. Amplificación del ADN proveniente del ChIP	62
4.8. Real Time	63
4.8.1. Extracción de ARN	63
4.8.2. Obtención del ADNc: Transcripción reversa o retrotranscripción (RT)	63
4.8.3. PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)	63
4.9. Bibliografía	65
Capítulo 5. Técnicas de histología e inmunohistoquímica	66
5.1. Estudios histológicos	66
RESULTADOS Y DISCUSION	67
Capítulo 1. Expresión del ALA-S1 en un modelo murino de diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	68
1.1. Modelo de diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	68
1.2. Niveles de glucosa e insulina en los ratones tratados con STZ	68
1.3. Estudios histológicos del páncreas	70
1.4. Niveles de expresión del ARNm del ALA-S1 hepática en los ratones diabéticos	73
1.5. Niveles de expresión de proteína del ALA-S1 hepática en los ratones diabéticos	75
1.6. Determinación de precursores del hemo en el modelo de diabetes tipo 1	76
1.7. Niveles de AMPc en el hígado de los animales diabéticos	78
1.8. Bibliografía	80

Capítulo 2. Efecto de la insulina y el vanadato sobre la expresión del ALA-S1 en un modelo murino de diabetes mellitus tipo 1	
2.1. Niveles de glucosa e insulina en los ratones diabéticos tratados con insulina o vanadato	83
2.2. Efecto de la insulina y el vanadato sobre el ARNm y la proteína del ALA-S1 en los animales diabéticos	85
2.3. Efecto de la insulina y el vanadato sobre la fosforilación de IRS1 en los ratones diabéticos	88
2.4. Efecto de la insulina y el vanadato sobre la fosforilación de Akt en los ratones diabéticos	90
2.5. Efecto de la insulina y el vanadato sobre los niveles nucleares de FOXO1 y PGC-1 α en el hígado de los ratones diabéticos	92
2.6. Estudio del factor de transcripción NRF-1 en los animales diabéticos y en los grupos tratados con insulina y vanadato	95
2.7. Efecto de la insulina y vanadato sobre los niveles de AMPc, Erk1/2 y el factor de transcripción CREB en el hígado de los animales diabéticos	97
2.8. Bibliografía	101
Capítulo 3. Efecto del vanadato sobre la expresión de la ferroquelatasa en un modelo murino de diabetes mellitus tipo 1	105
3.1. Niveles de expresión del ARNm de la FQ en animales diabéticos en función del tiempo	106
3.2. Efecto del vanadato sobre la expresión del ARNm y la proteína de la FQ en los animales diabéticos	107
3.2.1. Influencia del metabolismo del hierro sobre la traducción de la FQ	110
3.3. Efecto del vanadato sobre la regulación transcripcional del ARNm de la FQ en un modelo de diabetes mellitus tipo 1-glicosilación de Sp1	112
3.4. Bibliografía	116
CONCLUSIONES	118

Abreviaturas

ABC	Transportador del tipo cassette que une ATP
AC	Adenilato ciclasa
ACO2	Aconitasa mitocondrial
ADRES	Secuencias enhancer del Ala-sintetasa que responde a drogas
AGEs	Proteínas circulantes glicosiladas no enzimáticamente
Akt	Proteína quinasa B
ALA	Ácido delta-aminolevúlico
ALA-D	Ácido delta-aminolevúlico deshidrogenasa
ALA-S	delta-aminolevulinato sintetasa
ALA-S2	delta-aminolevulinato sintetasa eritroide específica
CAR	Receptor constitutivamente activo
CBP	Proteína de unión a CREB
CPH	Coproporfiria Hereditaria
CPO	Coproporfinógeno III oxidasa
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
CREB	Proteína que se une al elemento de respuesta a AMPc
CytPTKs	Proteínas tirosina-quinasa citosólica independientes del receptor de insulina
DMT1	Transportador de metales divalente 1
ECL	“Enhanced chemiluminiscent system”
Erk	Quinasa regulada por señales extracelulares
FOXO	“Forkhead Box subclass O”
FQ	Ferroquelatasa
G6Pasa	Glucosa-6-fosfatasa
GATA-1	Proteína perteneciente a la familia de factores de transcripción GATA
Grb2	Proteína 2 que se une al receptor del factor de crecimiento
GSK	Glucógeno sintetasa quinasa
HIF2 α	Factor de transcripción inducible por hipoxia
IGF-1	Factores de crecimiento similares a la insulina
IR	Receptor de insulina
IRE	Elemento de respuesta a insulina
IRE	Elemento que responde a hierro
IRS1	Sustrato del receptor de insulina 1
IRP1	Proteína regulada por hierro 1
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
membPTK	PTK localizada exclusivamente en la membrana plasmática
MEK	MAP quinasa quinasa
mTOR	Quinasa de mamífero blanco de rapamicina
NaOV	Ortovanadato de sodio
NF-E2	Factor nuclear eritroide-2
NPA	Nueva Porfiria Aguda
NRF-1	Factor de respiración nuclear-1
O-GlcNac	O-N-acetil glucosamina
OGT	O-ligando b-N-acetilglucosamina transferasa
PAI	Porfiria aguda intermitente

PB	Fenobarbital
PBG	Porfobilinógeno
PBGD	Porfobilinógeno deaminasa
PDK1	Proteína quinasa dependiente de fosfoinosítido 1
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxiquinasa
PGC-1 α	“Proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α ”
PI(3,4)P2	Fosfatidilinositol (3,4)-bifosfato
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PP2A	Serina-treonina proteína fosfatasa -2A
pp90 ^{RSK}	Quinasa de serinas/treoninas pp90 ribosomal S6
PPOX	Protoporfirinógeno IX oxidasa
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTK	Proteína tirosina quinasa
PTPasas	Fosfoproteína tirosina fosfatasas
PV	Porfiria variegata
PXR	Receptor X de pregnano
RAGEs	Receptores de AGEs
Ser	Serina
SH-2	Dominio de homología Src-2 de unión a fosfotirosinas
SOS	Son-of-sevenless
STZ	Estreptozotocina
TfR1	Receptor de transferrina 1
Thr	Treonina
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TRE	Elemento de respuesta a TPA
Tyr	Tirosina
Ub	Ubiquitina
URO-D	Uroporfirinógeno III decarboxilasa
URO-S	Uroporfirinógeno III sintetasa
UTRs	Regiones no traducidas
V	Vanadato
VO ³⁻	Anión vanadato
VS	Vanadil sulfato

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

METABOLISMO DEL HEMO - PORFIRIAS

1.1. Hemo

El grupo hemo es un tetrapirrol formado por un átomo de hierro (Fe^{2+}) y la protoporfirina IX (Furuyama *et al.*, 2007) (Fig. 1).

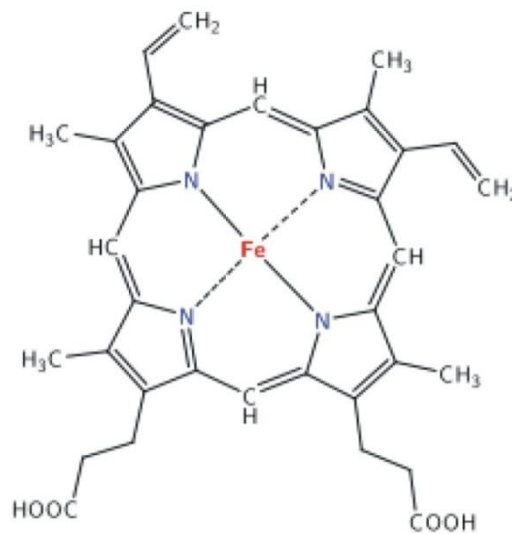


Figura 1 Estructura del grupo hemo

El átomo de hierro del hemo existe en dos estados oxidativos, ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}). El estado ferroso presenta una alta afinidad por el oxígeno y puede ser oxidado reversiblemente a férrico por la transferencia de un electrón. Esta característica le permite funcionar como transportador de un electrón, participar como catalizador en reacciones redox que involucran al oxígeno y ser un transportador del mismo (May *et al.*, 1995).

El hemo que está asociado a apo-proteínas participa en la transferencia de electrones, generación de energía, síntesis y degradación de esteroides, lípidos y neurotransmisores (citocromos), en el transporte (hemoglobina) y en el metabolismo

del O₂ (peroxidasas, oxidasas, catalasas e hidroxilasas) (May *et al.*, 1995; Furuyama *et al.*, 2007).

En eucariontes se conocen cuatro tipos de hemo: el protohemo, y los hemos a, b y c (Barros & Tzagoloff, 2002; Barros *et al.*, 2002). El protohemo es el precursor de los otros tres tipos de tetrapirroles y se encuentra como pool libre o débilmente asociado a proteínas, como por ejemplo en la triptofano pirrolasa (Atamna *et al.*, 2002).

Los hemo b y c son similares al protohemo, con modificaciones menores que ocurren a medida que son incorporados dentro de cada tipo específico de apoproteína (Atamna *et al.*, 2002). La síntesis del hemo a ocurre a partir de modificaciones del hemo b (Barros & Tzagoloff, 2002; Barros *et al.*, 2002).

El hemo a es el transportador de electrones de las citocromo oxidasas (COXs) mitocondriales y de la de algunas bacterias (Barros & Tzagoloff, 2002; Barros *et al.*, 2002). La catalasa, el citocromo P450, la hemoglobina y los complejos mitocondriales II y III contienen hemo b, mientras que el hemo c se encuentra en la óxido nítrico sintetasa, en el citocromo c y en el citocromo c1 del complejo III mitocondrial (Atamna *et al.*, 2002).

1.2. Biosíntesis del hemo

En los eucariontes, la vía biosintética del hemo está presente en todos los tipos celulares con excepción de los eritrocitos maduros. En la biosíntesis del hemo participan ocho enzimas. La primera y las tres últimas son mitocondriales y las restantes citosólicas (Furuyama *et al.*, 2007) (Fig. 2).

La primera enzima de esta vía y limitante de su velocidad es la delta-aminolevulinato sintetasa (ALA-S) que cataliza la condensación de la glicina con la succinil CoA para formar el ácido delta-aminolevúlico (ALA). Se encuentra en la matriz mitocondrial y requiere como cofactor al fosfato de piridoxal (Furuyama *et al.*, 2007).

En el segundo paso de la biosíntesis del hemo, la enzima citosólica ALA dehidratasa (ALA-D) condensa dos moléculas de ALA para formar un pirrol, el porfobilinógeno (PBG) (May *et al.*, 1995; Furuyama *et al.*, 2007).

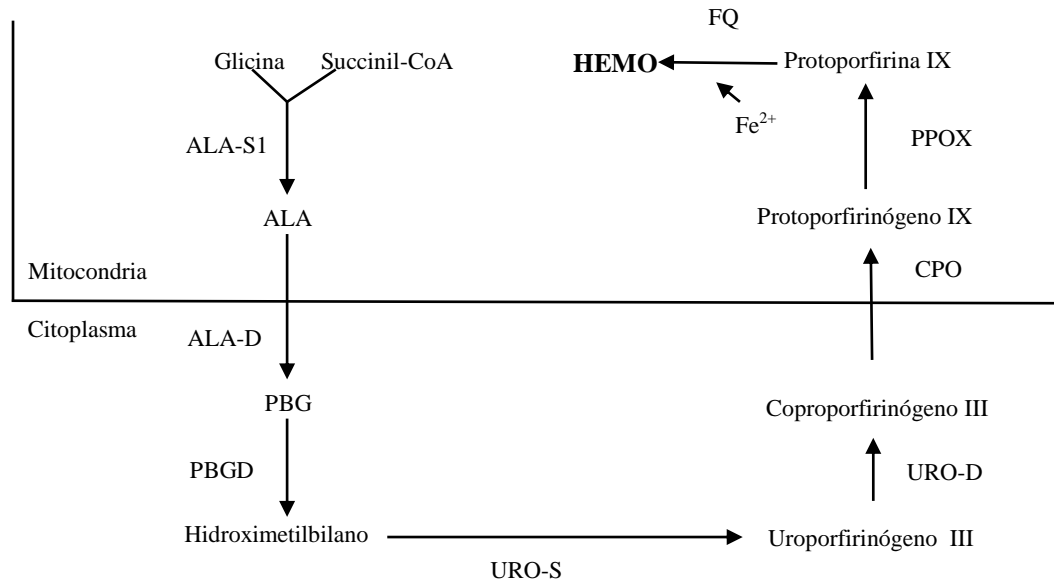


Figura 2 La vía biosintética del hemo involucra ocho pasos enzimáticos. ALA-S1, delta-aminolevulinato sintetasa; ALA, ácido delta-aminolevulónico; ALA-D, ALA dehidratasa; PBG, porfobilinógeno; PBGD, porfobilinógeno deaminasa; URO-S, uroporfirinógeno III sintetasa; URO-D, uroporfirinógeno III decarboxilasa; CPO, coproporfirinógeno III oxidasa; PPOX, protoporfirinógeno oxidasa; FQ, ferroquelatasa.

A continuación, la enzima porfobilinógeno deaminasa (PBGD) une secuencialmente cuatro moléculas de PBG para dar un intermediario inestable, llamado hidroximetilbilano (Herrick & McColl, 2005).

En el próximo paso, la enzima uroporfirinógeno III sintetasa (URO-S) cataliza la ciclación del hidroximetilbilano a uroporfirinógeno III por una inversión concomitante de los cuatro anillos del macrociclo. En ausencia de esta enzima, el intermediario inestable se cicla no enzimáticamente sin reorganizar los anillos pirrólicos, para dar el isómero uroporfirinógeno I (Heinemann *et al.*, 2008).

La enzima citosólica uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D), elimina los grupos carboxilo de las cadenas laterales acetilo del tetrapirrol para dar el coproporfirinógeno III que es transportado al interior de la mitocondria por las

proteínas “cassette B6 que une ATP” (ABCB6) (Krishnamurthy *et al.*, 2006) o “transportador del 2-oxo-glutarato” (SLC25A11) (Kabe *et al.*, 2006). Esta enzima también puede transformar el uroporfirinógeno I en coproporfirinógeno I que no puede ser metabolizado en el siguiente paso de la vía y que junto con el uroporfirinógeno I es un producto final tóxico.

La coproporfirinógeno III oxidasa (CPO) convierte al coproporfirinógeno III en protoporfirinógeno IX. En los mamíferos esta enzima se encuentra en el espacio intermembrana mitocondrial. Es un homodímero que carece de iones metálicos o cofactores. Necesita oxígeno molecular como aceptor final de electrones liberando dos moléculas de CO₂ (Heinemann *et al.*, 2008).

El protoporfirinógeno IX es oxidado por la enzima protoporfirinógeno IX oxidasa (PPOX) localizada en la membrana interna mitocondrial para formar la protoporfirina IX. En este paso se eliminan seis electrones formándose un sistema de dobles enlaces conjugados. Intervienen como cofactor la flavina y como aceptor final de los electrones el oxígeno molecular (Heinemann *et al.*, 2008).

Finalmente, la ferroquelatasa (FQ), localizada en la membrana mitocondrial interna, cataliza la inserción del hierro ferroso en la protoporfirina IX para formar el hemo. Éste es transportado al citosol y de allí distribuido hacia otros compartimentos celulares o es empleado para la formación de los citocromos respiratorios mitocondriales (May *et al.*, 1995).

En las plantas, existe un mecanismo alternativo para la síntesis de tetrapirroles a partir de glutamato vía el glutamil ARNt y el glutamato 1-semialdehído. Esta vía también está presente en algas y bacterias (Beale & Weistein, 1991).

Debido a que una deficiencia o un exceso de hemo son perjudiciales para la célula, su producción está finamente regulada para asegurar una provisión intracelular adecuada. Esto se alcanza a través de un delicado balance entre su biosíntesis principalmente a nivel del ALA-S1 hepática y su degradación por la enzima hemo oxigenasa (HO) (Furuyama *et al.*, 2007).

1.3. Porfirias

Las porfirias son desórdenes metabólicos resultantes de una deficiencia, heredada o adquirida, de una de las enzimas involucradas en la biosíntesis del hemo. (Kauppinen, 2005).

De acuerdo con el defecto enzimático, cada porfiria está asociada con determinadas características clínicas y patrones específicos de sobreproducción y excreción de porfirinas e intermediarios de la síntesis de hemo (Kauppinen, 2005) (Tabla 1).

Las porfirias pueden diferenciarse en eritropoyéticas, hepáticas y hepato eritropoyética dependiendo del órgano primario en el que tenga lugar la producción excesiva de porfirinas o precursores de porfirinas (Doss *et al.*, 2000) (Tabla 1).

Desde el punto de vista clínico se dividen en porfirias agudas caracterizadas por ataques agudos con síndrome neuro-abdominal asociados a una producción y excreción urinaria masiva de los precursores ALA y PBG y en porfirias no agudas, caracterizadas por fotosensibilidad resultante de la acción de la luz sobre las porfirinas acumuladas en la piel (Doss *et al.*, 2000) (Tabla 1).

1.3.1. Porfirias agudas

Entre las porfirias agudas se encuentran la porfiria aguda intermitente (PAI), la coproporfiria hereditaria (CPH), la porfiria variegata (PV) y la nueva porfiria aguda (NPA). Las deficiencias enzimáticas de cada una de ellas se hallan a nivel de las enzimas: PBGD, CPO, PPOX y ALA-D respectivamente (Doss *et al.*, 2000) (Tabla 1).

Desde el punto de vista bioquímico estos desórdenes se caracterizan por un defecto en las enzimas específicas de la ruta biosintética del hemo con la consiguiente inducción hepática del ALA-S1 y el aumento de los precursores neurotóxicos ALA y PBG, en plasma y orina en la PAI, CPH y PV y de ALA en la NPA (Herrick & McColl, 2005).

Tipo de Porfiria		Enzima deficiente	Clasificación según sintomatología	
Hepáticas	Porfiria Aguda Intermittente (PAI)	PBGD	Agudas	No Cutáneas
	Nueva Porfiria Aguda (NPA)	ALA-D		
	Porfiria Variegata (mixta) (PV)	PPOX		
	Coproporfiria Hereditaria (mixta) (CPH)	CPO		
	Porfiria Cutánea Tardía (PCT) Hereditaria/Adquirida	URO-D	No Agudas	Cutáneas
Eritropoyéticas	Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE)	URO-S		
	Protoporfiria Eritropoyética (PPE)	FQ		
Hepato eritropoyéticas	Porfiria Hepatoeritropoyética (PHE)	URO-D		

Tabla 1 Deficiencias enzimáticas en la vía biosintética del hemo que producen una determinada porfiria. ALA-D, ALA dehidratasa; PBGD, porfobilinógeno deaminasa; URO-S, uroporfirinógeno III sintetasa; URO-D, uroporfirinógeno decarboxilasa; CPO, coproporfirinógeno oxidasa; PPOX, protoporfirinógeno oxidasa; FQ, ferroquelatasa.

Clínicamente se presentan como ataques agudos consistentes en una crisis neurovisceral en la que participan los sistemas nerviosos autónomo, periférico y central. La duración de estos ataques puede extenderse desde días a semanas (Herrick & McColl, 2005). A menudo comienzan con un malestar general que provoca pequeños cambios del comportamiento como ansiedad, intranquilidad e insomnio. Durante la crisis, la mayoría de los pacientes presentan dolor abdominal severo, que también puede irradiarse a la espalda y piernas. Son comunes las náuseas, vómitos y constipación. También, puede manifestarse taquicardia, exceso de sudoración e hipertensión. Durante los ataques agudos, los pacientes, generalmente se deshidratan y se produce un desbalance de electrolitos que puede provocar convulsiones (Puy *et al.*, 2010).

Los ataques pueden precipitarse por una variedad de factores endógenos y exógenos que incluyen drogas farmacéuticas (por ejemplo, sulfonamidas, barbituratos, fenitoína, etc.), la ingesta de alcohol, el ayuno, y las hormonas esteroides. Por lo general, las manifestaciones clínicas aparecen luego de la pubertad y son más frecuentes en las mujeres (Kauppinen, 2005).

1.3.1.1. Tratamiento del ataque agudo

Por más de 30 años, la infusión de hemo o la ingesta de hidratos de carbono ha sido el tratamiento de primera elección para los ataques de PA (Stein & Tschdy, 1970; Herrick *et al.*, 1989).

La administración de hemo es clínicamente eficaz ya que provoca una disminución en la producción de porfirinas a través de la represión del ALA-S1 mediante un feed-back negativo (McColl *et al.*, 1981). Sin embargo, este efecto es de corta duración probablemente debido a que el hemo induce a la hemo-oxigenasa que media su catabolismo (Meissner *et al.*, 2001).

La otra terapia específica recomendada para el ataque de PA es la administración de carbohidratos. Cuando se comenzaron a realizar estudios clínicos se sugirió que aproximadamente el 75 % de los pacientes respondería favorablemente a la administración intravenosa u oral de glucosa (Doss *et al.*, 1985). También se comprobó en porfirias experimentales y en la PAI humana que la ingesta de

carbohidratos inhibía la inducción del ALA-S1 hepática. Sin embargo, la ingesta terapéutica de carbohidratos hace que los pacientes aumenten de peso. Este efecto secundario puede convertirse en adverso ya que para estos individuos la pérdida de peso puede ser muy difícil debido al riesgo de ataques inducidos por el ayuno o la reducción en la ingesta de hidratos de carbono.

1.4. Porfirias agudas y “efecto glucosa”

Se conoce que el ayuno es uno de los agentes causales de los ataques de porfiria aguda en pacientes con porfiria latente. Un alto consumo de glucosa mejora los signos bioquímicos y clínicos así como los síntomas del ataque agudo en numerosos pacientes (Stein & Tschdy, 1970). Subsecuentemente se demostró que otros carbohidratos tienen un marcado efecto sobre el metabolismo de las porfirinas en humanos con porfiria aguda tanto en la fase latente como durante los ataques (Brodie *et al.*, 1977).

La ingesta de grandes cantidades de carbohidratos provoca un aumento en la producción de insulina en las células β del páncreas. Una de las hipótesis que se plantean para explicar el efecto de la glucosa es que la insulina reprime la expresión del ALA-S1 hepática provocando una disminución en la producción de precursores de porfirinas y disminuye así los síntomas del ataque agudo (Robinson & Kessler, 1992).

La inducción de la porfiria experimental en animales de laboratorio mediante la administración de un agente porfirinogénico de acción rápida, como el (AIA) alilisopropilacetamida o la 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dehidrocolina (DDC) ocurre sólo cuando el animal está en estado de ayuno. La administración de distintos carbohidratos contrarresta el efecto porfirinogénico de estas drogas (Bonkowsky *et al.*, 1973). Éste fenómeno se denomina “efecto glucosa”.

Yalouris & Raptis (1987) observaron en una población de pacientes PAI que los ataques que usualmente se presentaban con sintomatología agresiva, tendían a ser menos frecuentes y finalmente se detenían bruscamente después de los 40 años y que estos períodos libres de crisis coincidían con estadios clínicos latentes y tempranos de la diabetes. Estos hallazgos los llevaron a concluir que debido a que un alto consumo de glucosa o hidratos de carbono ofrece protección contra los ataques de

PA, no era irracional sugerir que la hiperglucemia constante debida a la diabetes latente o manifiesta podía tener en los pacientes PAI un efecto similar.

1.5. Bibliografía

- ✓ Atamna H., Walter P. & Ames B. (2002) The role of heme and iron-sulfur clusters in mitochondrial biogenesis, maintenance, and decay with age. *Arch. Biochem. Biophys.* **397(2)**: 345-353.
- ✓ Barros M. & Tzagoloff A. (2002) Regulation of the heme A biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **516(1-3)**: 119-123.
- ✓ Barros M., Nobrega F. & Tzagoloff A. (2002) Mitochondrial ferredoxin is required for heme A synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277(12)**: 9997-10002.
- ✓ Beale S. & Weistein J. (1991) "Biochemistry and regulation of photosynthetic pigment, formation in plants and bacteria". Biosynthesis of tetrapyrroles. Ed.: Jordan P., New Comprehensive Biochemistry Series, Eds.: Neuberger A. & van Deemen L., Elsevier, Amsterdam, vol. 19, pp. 155-236.
- ✓ Bonkowsky H., Collins A., Doherty J. & Tschudy D. (1973) The glucose effect in rat liver: studies of delta-aminolevulinate synthase and tyrosine aminotransferase. *Biochim Biophys Acta.* **320**: 561-575.
- ✓ Brodie M., Moore M., Thompson G. & Goldberg A. (1977) The treatment of acute intermittent porphyria with laevulose. *Clin Sci Mol Med.* **53**: 365-371.
- ✓ Doss M., Sixel-Dietrich F. & Verspohl F. (1985) "Glucose effect" and rate limiting function of uroporphyrinogen synthase on porphyrin metabolism in hepatocyte culture: relationship with human acute porphyrias. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **23**: 505-513.
- ✓ Doss M., Kühnel A. & Gross U. (2000) Alcohol and porphyrin metabolism. *Alcohol Alcohol.* **35(2)**: 109-125.
- ✓ Furuyama K., Kaneko K. & Vargas P. (2007) Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku J. Exp. Med.* **213(1)**: 1-16.
- ✓ Heinemann I., Jahn M. & Jahn D. (2008) The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **474(2)**: 238-251.

- ✓ Herrick A., McColl K., Moore M., Cook A. & Goldberg A. (1989) Controlled trial of haem arginate in acute hepatic porphyria. *Lancet*. **1(8650)**: 1295-1297.
- ✓ Herrick A. & McColl K. (2005) Acute intermittent porphyria. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **19(2)**: 235-249.
- ✓ Kabe Y., Ohmori M., Shinouchi K., Tsuboi Y., Hirao S., *et al.* (2006) Porphyrin accumulation in mitochondria is mediated by 2-oxoglutarate carrier. *J. Biol. Chem.* **281(42)**: 31729-31735.
- ✓ Kauppinen R. (2005) Porphyrias. *Lancet*. **365(9455)**: 241-252.
- ✓ Krishnamurthy P., Du G., Fukuda Y., Sun D., Sampath J. *et al.* (2006) Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature*. **43(7111)**: 586-589.
- ✓ May B., Dogra S., Sadlon T., Bhasker C., Cox T. *et al.* (1995) Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates. *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* **51**: 1-51.
- ✓ McColl K., Moore M., Thompson G. & Goldberg A. (1981) Treatment with haematin in acute hepatic porphyria. *Q. J. Med.* **50(198)**: 161-174.
- ✓ Meissner P., Hift R. & Kirsch R. (2001) "The porphyrias". *The Liver: Biology and Pathobiology*. 4th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins pp: 311-329.
- ✓ Puy H., Gouya L. & Deybach J. (2010) Porphyrias. *Lancet*. **375(9718)**: 924-937.
- ✓ Robinson S. & Kessler A. (1992) Diabetes secondary to genetic disorders. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* **6(4)**: 867-898
- ✓ Stein J. & Tschudy D. (1970) Acute intermittent porphyria. A clinical and biochemical study of 46 patients. *Medicine*. **49**:1-16.
- ✓ Yalouris A. & Raptis S. (1987) Effect of diabetes on porphyric attacks. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*. **295(6608)**: 1237-1238.

Capítulo 2

METABOLISMO DEL VANADIO

2.1. Vanadio

El vanadio es un metal blanco plata, brillante, suave, dúctil y uno de los más abundantes en la corteza terrestre. Pertenece a la primera serie de elementos de transición. Es un miembro del grupo VB de la tabla periódica. Puede hallarse en cuatro estados de valencia: 2, 3, 4 y 5. El estado de oxidación del vanadio *in vitro* e *in vivo* está relacionado con la variedad de efectos biológicos que presenta este elemento (Srivastava & Mehdi, 2005).

La principal fuente de vanadio para los mamíferos se encuentra en los alimentos como hongos, mariscos, semillas de eneldo, perejil, pimienta negra, cereales, pescados, frutas frescas y vegetales (Mukherjee *et al.*, 2004). Se ha estimado que la ingesta diaria proveniente de los alimentos es de 10-160 µg. El análisis de los fluidos corporales, órganos y tejidos, ha calculado que el pool total en humanos se encuentra entre 100 y 200 µg y el rango en células de mamíferos es de 0,014 a 7,2 µM (Srivastava & Mehdi, 2005).

2.2. Absorción, distribución y excreción

En los sistemas vivos los mecanismos de absorción, excreción y almacenamiento del vanadio todavía no han sido completamente dilucidados (Pessoa *et al.*, 2015). A pH fisiológico, el vanadio se encuentra como anión vanadato (VO^{3-}) en el estado de oxidación pentavalente que es la forma más estable entre sus diversos estados de oxidación (Evangelou, 2002).

En los fluidos corporales extracelulares predomina la forma VO^{3-} mientras que el catión vanadilo (VO^{2+}) es la forma intracelular más común (Srivastava & Mehdi, 2005).

El vanadato entra en la célula a través del mecanismo de transporte de aniones (Srivastava & Mehdi, 2005). En los eritrocitos, es reducido al catión

vanadilo por el glutatión y/o el ácido ascórbico y en el plasma por otras sustancias reductoras (Evangelou, 2002). El vanadato y el vanadilo son transportados hacia el resto del organismo por la transferrina y el vanadilo por la albúmina con quienes se asocian selectivamente (Mukherjee *et al.*, 2004).

En las células, el vanadio se distribuye principalmente en el núcleo y en las fracciones solubles del sobrenadante. En el citosol el vanadato y el vanadilo están unidos a determinados grupos fosfato, carboxilo y amino (Evangelou, 2002).

Varios estudios realizados en modelos animales indican que el vanadio se acumula principalmente en los riñones, bazo, hígado y en los huesos y en menor medida en los pulmones y los testículos. Los efectos del vanadio persisten luego de varias semanas de finalizada su administración. Cuando existe una demanda bioquímica los órganos y tejidos pueden liberarlo. El vanadio no absorbido es excretado en la bilis, orina y materia fecal (Mukherjee *et al.*, 2004).

2.3. Toxicidad sistémica del vanadio

Los efectos tóxicos más comunes de los compuestos de vanadio en mamíferos son: diarrea, caída en el consumo de alimentos y líquido, deshidratación, hipofagia y disminución en la recuperación de peso corporal. Estas consecuencias pueden corregirse por el agregado de NaCl en el agua de bebida, ajustando el pH de la solución a neutralidad y aumentando gradualmente la dosis (Srivastava & Mehdi, 2005). También pueden producir irritación local de los ojos y del tracto respiratorio (Mukherjee *et al.*, 2004).

Otros efectos tóxicos de las sales de vanadio, incluyen hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y teratogenicidad (Domingo, 2002). Sin embargo, diferentes estudios no han podido detectar cambios en los niveles de urea y creatinina, índices de la función renal ni en los niveles de las enzimas glutámico oxalacetato transaminasa y glutámico pirúvico transaminasa, índices de la función hepática (Srivastava, 2000).

La dosis letal (LD50) de vanadio depende de la especie, edad y dieta. En ratas la LD50 de metavanadato de sodio es de 0,15 mmol/kg *i.p.* y 0,8 mmol/kg por sonda. En ratones es 0,2-0,3 mmol V/kg *i.p.* (Mukherjee *et al.*, 2004).

La velocidad de eliminación de la sangre, suero y orina depende de la especie química del vanadio y la vía de administración (Sabbioni *et al.*, 1996). La toxicidad se acrecienta a medida que aumenta su valencia (Mukherjee *et al.*, 2004). Los compuestos orgánicos de vanadio son mucho más seguros como agentes antidiabéticos que las sales inorgánicas ya que no presentan efectos gastrointestinales colaterales ni desarrollan diarrea en ratas diabéticas (Srivastava & Mehdi, 2005).

2.4. Efecto del vanadato sobre la vía de acción de la insulina

2.4.1. Cascada de señalización de la insulina

El receptor de la insulina (IR) es una proteína tirosina-quinasa que se activa por la unión de la hormona. Se auto-fosforila y posteriormente se fosforilan varias proteínas endógenas en residuos tirosina (Goldwaser *et al.*, 2000) llamadas "proteínas de acoplamiento", como: los sustratos del receptor de insulina (IRSs), la proto-oncogen proteína tirosina quinasa (Src), la proteína homóloga del colágeno (Shc), proteínas adaptadoras (Grb-2, Nck, Crk), la proteína tirosina fosfatasa que contiene el dominio SH2 ((SHP)-2) (Draznin, 2006) (Fig. 1).

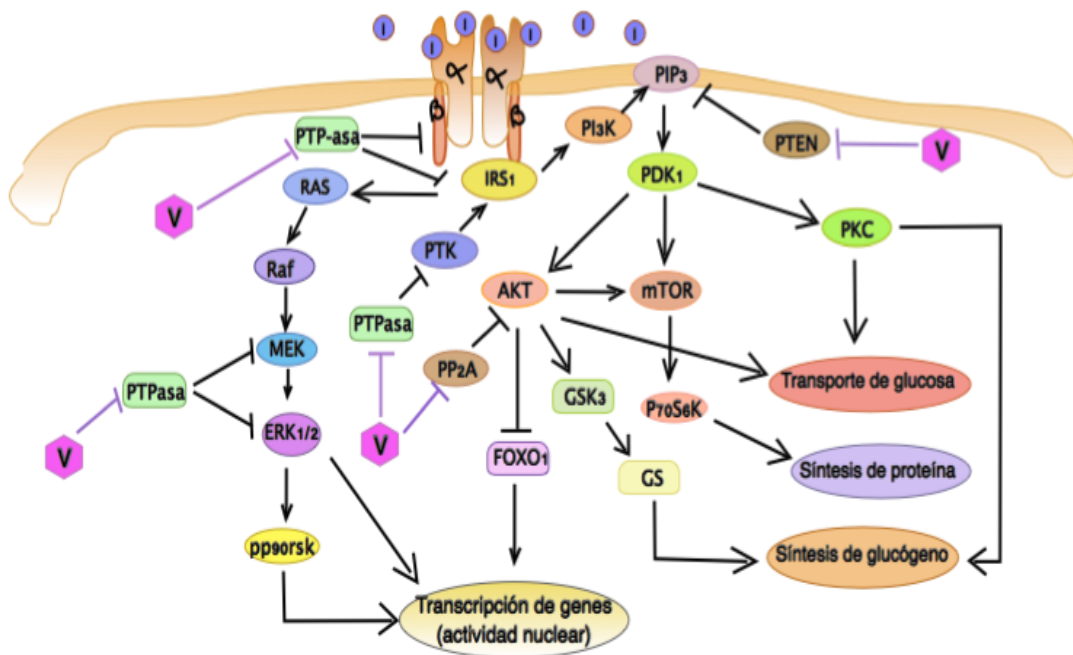


Figura 1 Vías de señalización de la insulina Insulina (I), vanadato (V)

La mayoría de los efectos metabólicos y antiapoptóticos de la insulina están mediados por las vías de señalización en las que intervienen IRSs, PI3K, PDK1, Akt, la quinasa de mamífero blanco de rapamicina (mTOR) y la quinasa río abajo p70 ribosomal S6 quinasa-1 (p70S6K1) (Draznin, 2006). Por el contrario, los efectos proliferativos, y mitogénicos de la insulina son mediadas en gran parte a través de la activación de Ras, Raf, MAP quinasa quinasa (MEK) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos Erk1 y Erk2 (Draznin, 2006) (Fig. 1).

2.4.2. Vanadio: agente insulino-mimético

Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*, han revelado los efectos insulino-miméticos de los compuestos de vanadio, incluyendo la estimulación en el transporte y oxidación de glucosa, síntesis de glucógeno, lipogénesis, así como la inhibición de la lipólisis y la gluconeogénesis a través de la disminución en la expresión de las enzimas gluconeogénicas fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) y glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). Sin embargo, el mecanismo preciso a nivel molecular mediante el cual el vanadio ejerce su efecto antidiabético y similar al de la insulina está pobremente caracterizado (Pessoa *et al.*, 2015).

Las sales de vanadio son potentes inhibidoras de ATPasas como la Na^+/K^+ -ATPasa, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa (Fukunaga & Kawano, 2003) y fosfatasas como las fosfoproteína tirosina fosfatasas (PTPasas) (Srivastava & Mehdi, 2005). El vanadato actúa como un análogo del ión fosfato (Krejsa & Schieven, 1998). Inicialmente se supuso que en virtud de su capacidad de inhibir las PTPasas, activaba al IR en una forma insulino-independiente aumentando su fosforilación en residuos tirosina (Goldwasser *et al.*, 2000) (Fig. 1). Sin embargo, numerosos grupos han informado que en células y tejidos pre-tratados con vanadato no se observó un aumento significativo en el contenido de fosfotirosinas en el IR. Además, la quercetina, un agente bloqueante del receptor, que impide la trans-fosforilación, no pudo inhibir los efectos biológicos del vanadato (Sekar *et al.*, 1999).

A pesar de que las sales de vanadio no tienen efecto sobre la fosforilación en tirosina de la subunidad β del IR, varios estudios han encontrado un efecto estimulador del vanadil sulfato (VS) y del ortovanadato de sodio (NaOV) sobre la

fosforilación en tirosina del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1) y la activación de PI3K (Srivastava & Mehdi, 2005).

Estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* demostraron que el metal provoca la inhibición de varias formas de PTPasas incluyendo las que contienen dominios SH-2, PTP-1B y PTPasas totales (Srivastava & Mehdi, 2005) (Fig. 1).

Otro blanco del vanadio podría ser la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) que puede funcionar como una proteína fosfatasa de serinas/treoninas y tirosinas así como de lípidos. En particular, PTEN desfosforila los subproductos de PI3K, PI(3,4)P2 y PIP3, y al hacerlo antagoniza las vías de señalización que dependen de la actividad de PI3K/PDK1/Akt contrarrestando la actividad de PI3K (Prasad *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2006) (Fig. 1).

Estudios previos indicaron que la fosforilación en tirosina de PTEN podría disminuir su capacidad de hidrolizar los fosfoinosítidos y reducir su estabilidad. Cuando se indujo en ratas Sprague-Dawley una isquemia cerebral transitoria (15 minutos) se observó que el tratamiento de los animales con ortovanadato de sodio aumentó la fosforilación en tirosina de PTEN y activó la vía de señalización PTEN/PI3K/Akt funcionando como un inhibidor de la apoptosis durante la isquemia cerebral (Wu *et al.*, 2006).

Otro camino de señalización que parte de IRS1 fosforilado, por medio de la unión al complejo Grb2-SOS, lleva a la estimulación de p21 ras por unión a GTP y una subsecuente activación de Raf, MEK, así como de dos isoenzimas de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs), Erk1 y Erk2. Erk1/2 activadas fosforilan y activan río abajo a la quinasa de serinas/treoninas pp90 ribosomal S6 (pp90^{RSK}). Tanto Erk1/2 como, pp90^{RSK} pueden translocarse al núcleo donde fosforilan factores de transcripción que llevan a la expresión de sus genes blanco (Srivastava & Mehdi, 2005) (Fig. 1).

La máxima actividad de Erk1/2 se consigue cuando MEK1/2 fosforila los residuos Thr y Tyr que se encuentran en su loop de activación. Esta fosforilación provoca cambios conformacionales que elevan la velocidad catalítica de Erk1/2 de 5 a 6 órdenes de magnitud en comparación con la actividad basal. Además son necesarias en Erk1/2 fosforilaciones adicionales por más de una quinasa para su

traslocación nuclear. Erk1/2 puede presentar una activación transitoria, de alrededor de 20 minutos, o una sostenida de hasta 2 a 3 horas. Por lo tanto, para una correcta señalización mediada por Erk1/2 es necesario considerar la duración de la señal. El mecanismo principal de inactivación de Erk1/2 consiste en la eliminación de 1 o 2 de los fosfatos presentes en su loop de activación. La desfosforilación de una sola Tyr o Thr es suficiente para la inactivación completa. Por lo tanto en diversas condiciones actúan las Ser/Thr fosfatasas, las fosfatasas de Tyr y las fosfatasas de especificidad dual (MKPs) para inactivar a Erk1/2 (Wortzel & Seger, 2011).

Existen evidencias que indican que los compuestos del vanadio modulan el grado y duración de la fosforilación de MEK-1 y Erk1 aumentando los niveles de proteína y actividad de Erk1/2 (Theberge *et al.*, 2003) e inhibiendo la proliferación celular a través de la vía MAPK en forma dosis-respuesta (Barrio *et al.*, 2003).

2.5. Vanadato y tirosina quinasas citosólicas independientes de receptor de insulina

El estado de oxidación del vanadio también puede desempeñar un papel en la activación de las vías intracelulares de transducción de señales que regulan la activación de proteína tirosina-quinasa citosólicas independientes del receptor de insulina (CytPTKs) (Elberg *et al.*, 1994).

El vanadato, que no tiene ningún efecto sobre la proteína tirosina quinasa del receptor de insulina, estimula tres CytPTKs estudiadas. Estas son la de hígado, tejido graso y la del cerebro (Elberg *et al.*, 1994).

Las CytPTKs de tejidos clásicos como el tejido graso y el hígado que responden a la insulina, son activadas por concentraciones bajas de vanadato, mientras que la de cerebro necesita concentraciones mayores. La CytPTK de linfoma no responde al vanadato (Elberg *et al.*, 1994).

Los efectos biológicos del vanadato, tales como la lipogénesis y la oxidación de la glucosa, son mediados por CytPTKs de manera receptor de insulina independiente. Sin embargo, se carece de mecanismos adicionales para explicar los efectos del vanadio en la inhibición de la lipólisis y en la activación de la absorción

de hexosa (Goldwaser *et al.*, 2000). Se ha identificado otra proteína tirosina quinasa (PTK) localizada exclusivamente en la membrana plasmática (membPTK) independiente del receptor de insulina (Elberg *et al.*, 1997). Esta membPTK participaría en los efectos del vanadato no-mediados por CytPTKs y también podría activar a PI3K (Goldwaser *et al.*, 2000).

2.6. Bibliografía

- ✓ Barrio D., Williams P., Cortizo A. & Etcheverry S. (2003) Synthesis of a new vanadyl (IV) complex with trehalose (TreVO): insulin-mimetic activities in osteoblast-like cells in culture. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8(4)**: 459-468.
- ✓ Domingo J. (2002) Vanadium and tungsten derivatives as antidiabetic agents: a review of their toxic effects. *Biol. Trace. Elem. Res.* **88**: 97-112.
- ✓ Draznin B. (2006) Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes.* **55(8)**: 2392-2397.
- ✓ Elberg G., Li J. & Shechter Y. (1994) Vanadium activates or inhibits receptor and non-receptor protein tyrosine kinases in cell-free experiments, depending on its oxidation state. Possible role of endogenous vanadium in controlling cellular protein tyrosine kinase activity. *J. Biol. Chem.* **269(13)**: 9521-9527.
- ✓ Elberg G., He Z., Li J., Sekar N. & Shechter Y. (1997) Vanadate activates membranous non receptor protein tyrosine kinase in rat adipocytes. *Diabetes.* **146**: 1684.
- ✓ Evangelou A. (2002) Vanadium in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **42(3)**: 249-265.
- ✓ Fukunaga K. & Kawano T. (2003) Akt is a molecular target for signal transduction therapy in brain ischemic insult. *J. Pharmacol. Sci.* **92(4)**: 317-327.
- ✓ Goldwasser I., Gefel D., Gershonov E., Fridkin M. & Shechter Y. (2000) Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications. *J. Inorg. Biochem.* **80**: 21-25.
- ✓ Krejsa C. & Schieven G. (1998) Impact of oxidative stress on signal transduction control by phosphotyrosine phosphatases. *Environ. Health Perspect.* **106(5)**: 1179-1184.

- ✓ Mukherjee B., Patra B., Mahapatra S., Banerjee P., Tiwari A. *et al.* (2004) Vanadium an element of atypical biological significance. *Toxicol. Lett.* **150(2)**: 135-143.
- ✓ Pessoa J., Etcheverry S. & Gambino D. (2015) Vanadium compounds in medicine. *Coordination Chemistry Reviews.* **301**: 24-48.
- ✓ Prasad N., Topping R., Zhou D. & Decker S. (2000) Oxidative stress and vanadate induce tyrosine phosphorylation of phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1). *Biochemistry.* **39**: 6929-6935.
- ✓ Sabbioni E., Kuèera J., Pietra R. & Vesterberg O. (1996) A critical review on normal concentrations of vanadium in human blood, serum and urine. *Sci. Total Environ.* **188(1)**: 49-58.
- ✓ Sekar N., Li J., He Z., Gefel D. & Shechter Y. (1999) Independent signal-transduction pathways for vanadate and for insulin in the activation of glycogen synthase and glycogenesis in rat adipocytes. *Endocrinology.* **140(3)**: 1125-1131.
- ✓ Srivastava A. (2000) Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds. *Mol. Cell. Biochem.* **206**: 177-182.
- ✓ Srivastava A. & Mehdi M. (2005) Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabet. Med.* **22(1)**: 2-13.
- ✓ Theberge J., Mehdi M., Pandey S. & Srivastava A. (2003) Prolongation of insulin-induced activation of mitogen-activated protein kinases Erk1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase by vanadyl sulfate, a protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* **420(1)**: 9-17.
- ✓ Wortzel I & Seger R. (2011) The Erk Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer.* **2(3)**: 195-209.
- ✓ Wu D., Pei D., Wang Q. & Zhang G. (2006) Down-regulation of PTEN by sodium orthovanadate inhibits ASK1 activation via PI3-K/Akt during cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **404(1-2)**: 98-102.

Capítulo 3

DELTA-AMINOLEVULINATO SINTETASA

3.1. Descripción general

La delta-aminolevulinato sintetasa (ALA-S) es la primera enzima y reguladora de la vía de biosíntesis del hemo. El ALA-S cataliza la condensación de la glicina con la succinil CoA para formar el ácido delta-aminolevúlico (ALA). Esta enzima se encuentra ubicada en la matriz mitocondrial y requiere como cofactor al fosfato de piridoxal (Furuyama *et al.*, 2007).

Existen dos isoenzimas estrechamente relacionadas llamadas ALA-S1 y 2 codificadas en cromosomas diferentes. Los genes humanos para el ALA-S1 y 2 se han mapeado en los cromosomas 3p21.1 y Xp11.21 respectivamente. Estos genes se expresan en una forma tejido específico y están regulados de manera diferenciada (Furuyama *et al.*, 2007).

El gen “housekeeping” llamado ALA-S1, ALAS hepática (ALA-SH) o no específica (ALA-SN) (EC 2.3.1.37) se expresa en todas las células en un bajo nivel y es inducible principalmente en el hígado por drogas (Furuyama *et al.*, 2007). El ALA-S1 mitocondrial de mamíferos tiene una vida media aproximada de 60 minutos (Granick & Sassa, 1971). Mientras que la vida media del ARNm del ALA-S1 hepática de rata es de 20 minutos (Cable *et al.*, 2000).

El segundo gen denominado ALA-S2 o ALA-SE, está restringido a las células eritroides y es inducido por la eritropoyetina durante la diferenciación celular (Furuyama *et al.*, 2007).

Debido a que una deficiencia o un exceso de hemo son perjudiciales para la célula, su producción está finamente regulada para asegurar una provisión intracelular adecuada. Este control ocurre principalmente a nivel del ALA-S1 hepática (Handschin *et al.*, 2005).

En los hepatocitos el principal control de la biosíntesis del hemo lo constituye un pool regulatorio formado por el hemo libre citosólico y nuclear, y el hemo débilmente ligado a proteínas (Furuyama *et al.*, 2007).

Existen una serie de mecanismos mediante los cuales el hemo puede reprimir por feed back negativo al ALA-S1 que incluyen una reducción en la transcripción, traducción y estabilidad de su ARNm así como una inhibición en el transporte de la enzima al interior de la mitocondria (Furuyama *et al.*, 2007) (Fig. 1).

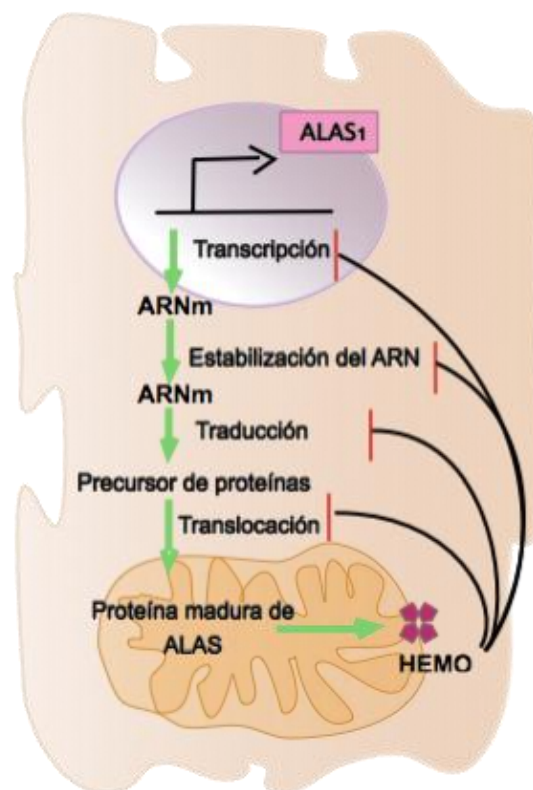


Figura 1 Regulación de la expresión del ALA-S1

3.2. Control de la transcripción del gen del ALA-S1

La regulación del ALA-S1 durante el ayuno y la alimentación está mediada por las hormonas contrarregulatorias insulina y glucagon (Handschin *et al.*, 2005).

Existen evidencias de que la insulina provoca una rápida inhibición de la expresión del gen del ALA-S1 y que una o más secuencias contenidas en 800 pb en

la región flanqueante 5' del gen podrían ser responsables de producir esta regulación negativa (Scassa *et al.*, 2001). Esta región es suficiente para la expresión basal y es capaz de conferir *in vitro* la inhibición mediada por insulina sobre la actividad del promotor (Scassa *et al.*, 2004).

Se han identificado en algunos genes varias regiones denominadas elementos o secuencias de respuesta a insulina (IREs/IRSs) que actúan en cis y median el efecto de la insulina sobre la transcripción (Scassa *et al.*, 1998; Scassa *et al.*, 2001).

Un análisis realizado por computadora del promotor del ALA-S1 reveló la presencia de una secuencia similar (-383 a -389pb) al IRE encontrado en el promotor de la PEPCK y dos secuencias (-397 a -387pb y -383 a -373pb) con un alto grado de homología con los motivos de unión del factor nuclear de hepatocito-3 (HNF-3) (Scassa *et al.*, 2001). También se encontró un posible sitio de unión del factor nuclear 1 (NF1) en una orientación inversa, localizado a -425pb (Scassa *et al.*, 2004).

La secuencia IRE en los promotores del ALA-S1, PEPCK y la G6Pasa se encuentra altamente conservada. En los genes gluconeogénicos, a este elemento se unen FOXO1 y su coactivador PGC-1 α . La regulación de estos genes por insulina depende de la estrecha cooperación de PGC-1 α con FOXO1. Handschin *et al* (2005) trabajando con hepatocitos de ratón, demostraron que la represión del promotor del ALA-S1 por insulina está controlada por la interacción FOXO1-PGC-1 α .

También se han identificado en el promotor del ALA-S1 dos sitios de unión para el factor de respiración nuclear (NRF-1) que son importantes para la expresión basal del gen como se confirmó por mutagénesis sitio dirigida (Braidotti *et al.*, 1993). Empleando una variedad de aproximaciones moleculares se comprobó que PGC-1 α interactúa y coactiva a NRF-1, unido a su secuencia consenso para regular el promotor del ALA-S1 durante el ayuno. Este mecanismo presumiblemente es insensible a insulina (Li, 2005).

Se ha demostrado en hepatocitos de rata y en células de hepatoma humano, que el AMPc induce el gen del ALA-S1 a través de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). Un análisis por delección de la región flanqueante 5' del gen housekeeping del ALA-S1 permitió identificar una importante región sensible a PKA localizada entre -156pb y -38pb que contiene dos motivos CRE (-149 a -45pb)

capaces de unir a CREB llamados C1 y C2 respectivamente (Guberman *et al.*, 2005). También se encontró que la región entre -75 a -38pb es crucial para la actividad transcripcional basal del promotor ALA-S1 (Giono *et al.*, 2001).

La región río arriba del promotor del ALA-S1 posee un elemento enhancer transcripcional llamado secuencia enhancer del ala-sintetasa que responde a drogas (ADRES) que contiene sitios de reconocimiento DR4 para los receptores nucleares huérfanos (NRs) conocidos como el receptor X de pregnano (PXR) y el receptor constitutivamente activo (CAR). Los elementos ADRES responden a una amplia gama de drogas y son responsables de la mayoría de la actividad transcripcional del gen *in vivo* (Thunell, 2006).

Otro elemento adicional que se encuentra en el promotor del ALA-S1 en primates, pero no en ratones, es un elemento de respuesta al receptor X farnesoide (FXR). Este receptor nuclear está involucrado en la homeostasis de los lípidos y de la glucosa así como en la detoxificación de xenobióticos (Thunell, 2006).

El 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), un éster de forbol, es un potente promotor tumoral que afecta la expresión génica y la síntesis de proteínas y ADN. Se sabe que el TPA reprime la expresión del ALA-S1 a nivel transcripcional. El promotor del ALA-S1 contiene un elemento de respuesta a TPA (TRE), localizado a -261pb a -255pb. La regulación de la expresión génica dependiente de diacilglicerol y ésteres de forbol, a menudo es mediada por las proteínas activadoras de factores de transcripción-1 (AP-1), que son heterodímeros formados por miembros de las familias de proteínas Jun y Fos (Guberman *et al.*, 2005).

Se ha identificado en el promotor del ALA-S1 una secuencia llamada elemento que responde a hemo (HRE). El hemo reprime la transcripción del ALA-S1 regulando la unión a esta secuencia del factor de transcripción de respuesta temprana-1 (Egr-1) y su correpresor NGFI-A proteínas de unión 1/2 (NAB1/2). La unión de este complejo es responsable del efecto directo del hemo sobre la inhibición de la transcripción del gen (Gotoh *et al.*, 2011).

La región promotora del ALA-S1 también contiene sitios de unión para el factor nuclear de hepatocitos 4 alfa ligando-independiente controlado por pulso de la hormona de crecimiento (HNF4 α) que participa en los procesos de detoxificación

(Thunell, 2006). Se considera que este factor es el regulador más importante del fenotipo de los hepatocitos (Watt *et al.*, 2003).

3.2.1. Modulación de la expresión por FOXO-PGC1 α

El efecto terapéutico de la glucosa en porfirias agudas hepáticas está bien documentado (Handschin *et al.*, 2005). La administración parenteral u oral de glucosa, y en casos severos complementado con insulina, bloquea rápidamente las vías de inducción del ALA-S1 a nivel transcripcional y post-traducciona (Thunell, 2006).

Se ha establecido que la transcripción del ALA-S1 es inhibida por la insulina a través de la vía que involucra a Akt (Handschin *et al.*, 2005).

La sobreexpresión de una mutante de Akt sin actividad quinasa disminuye la inhibición de la actividad del promotor del ALA-S1 mediada por insulina. Además un Akt constitutivamente activo, reduce la transcripción del gen reporte ALA-S1/CAT en forma similar a la insulina. Por lo tanto, en la vía de señalización de la insulina utilizada para inhibir la expresión génica del ALA-S1, Akt es necesaria como un mediador río abajo de PI3K. En hepatocitos de rata y células HepG2, los inhibidores de PI3K, wortmanina y LY294002, revierten la represión de la insulina sobre el ARNm endógeno del ALA-S1 así como la actividad de un constructo del promotor del ALA-S1 transfectado en células HepG2 (Scassa *et al.*, 2001).

Bajo condiciones de señalización de insulina Akt activado fosforila a FOXO1 en residuos treonina y serina, interrumpiendo su unión a PGC-1 α dando como resultado la exportación del factor de transcripción al citoplasma en una forma inactiva y vulnerable a la degradación por la vía ubiquitina-proteosoma. Las proteínas FOXO mutadas en los sitios de fosforilación por Akt muestran una actividad transcripcional de 3 a 5 veces mayor que las salvajes (Handschin *et al.*, 2005; Thunell, 2006) (Fig. 2).

mecanismos de inducción, como por ejemplo, la mediada por barbituratos (Handschin *et al.*, 2005).

3.2.2. Modulación de la expresión por CREB

El promotor del gen del ALA-S1 contiene elementos de respuesta a AMPc, por lo tanto durante el ayuno podría estar sujeto a una regulación directa por la vía de AMPc/CREB efecto que sería antagonizado por la glucosa (Giono *et al.*, 2001) (Fig. 2).

Un estudio del promotor del ALA-S1 reveló la presencia de 3 secuencias consenso CRE altamente homólogas como posibles elementos que actúan en cis (Giono *et al.*, 2001). En estos sitios, CREB se une y recluta a su coactivador CBP (Guberman *et al.*, 2003). Los dos elementos CRE río arriba son necesarios para una inducción completa del gen del ALA-S1. Sin embargo, el CRE más cercano al sitio de inicio de la transcripción es capaz de inhibir la actividad del promotor ALA-S1. CREB, a través de los sitios CRE media el efecto del AMPc sobre la expresión del gen, sin embargo, también podría actuar como represor de la transcripción, siendo capaz de revertir su papel después de ser fosforilado por PKA (Giono *et al.*, 2001).

En células HepG2 la cotransfección con un vector de expresión de CREB y otro de PKA, aumentó la inducción de la actividad transcripcional del promotor del ALA-S1. Sin embargo cuando PKA no es cotransfectada, CREB trabaja como un represor específico de la actividad basal del promotor del ALA-S1. Un CREB mutado, deficiente en el sitio de fosforilación de PKA, no es capaz de inducir la expresión del gen del ALA-S1 pero puede inhibir la actividad basal del promotor. Además, un CREB modificado que no puede unirse al ADN no interfiere con la actividad basal del promotor (Giono *et al.*, 2001).

La regulación negativa y positiva de CREB estaría modulada por su estado de fosforilación. La transactivación transcripcional está controlada por la fosforilación inducida por PKA de un residuo serina específico localizado en un sitio consenso para PKA. Las proporciones de CREB nuclear fosforilado y sin fosforilar, podrían determinar su potencia de transactivación transcripcional. Esta hipótesis es consistente con los estudios *in vitro* en los cuales los dímeros de CREB formados por

un monómero fosforilado y uno mutado presentan un 50 % de la actividad de transactivación del dímero salvaje fosforilado (Giono *et al.*, 2001). La falta de fosforilación de CREB, sin embargo no explica completamente la ausencia de actividad basal de este factor, debido a que CREB tiene un dominio de transactivación transcripcional que funciona en ausencia de fosforilación mediada por PKA (Nakajima *et al.*, 1996; Giono *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que la insulina reprime la transcripción de los genes que responden a AMPc como PEPCK interfiriendo en parte con la transactivación mediada por CREB. Luego de la fosforilación en la Ser133, CREB se une a CBP y forman un complejo esencial para la transcripción inducida por AMPc. CBP también media respuestas a señales mitogénicas como la de insulina (Scassa *et al.*, 1998). Varios estudios, han demostrado que la insulina puede interrumpir la interacción de los coactivadores CBP/p300 con varios factores de transcripción, por lo tanto, podría modificar las interacciones entre CBP/p300 y CREB (Scassa *et al.*, 2004). El grado de asociación de CREB y CBP es fundamental para la actividad de este promotor (Guberman *et al.*, 2003). La insulina inhibiría la inducción de los genes que responden a AMPc interfiriendo específicamente con la actividad de CBP (Nakajima *et al.*, 1996).

3.2.3. Control de la transcripción por Erk1/2

En hepatocitos de rata y células de hepatoma humano se demostró que para inhibir la expresión del gen del ALA-S1 mediada por insulina se requiere la activación en forma conjunta de dos vías de señalización, PI3K/Akt y Ras/Erk/pp90^{RSK}, consideradas funcionalmente separadas durante la acción de la insulina. Esto indicaría que estas dos vías convergen en un factor de transcripción común o un complejo blanco de la insulina (Scassa *et al.*, 2004) (Fig. 2).

Aunque la activación de Erk1/2 ocurre independientemente de PI3K, se encontró que en células de hepatoma humano Hep3B y hepatocitos de rata inhibidores de PI3K también inhibían un aumento en la actividad de Erk1/2 mediada por insulina (Scassa *et al.*, 2001).

El papel de Ras en la expresión del gen del ALA-S1 regulado por insulina se analizó por primera vez bloqueando la farnesilación de Ras con dos inhibidores estructuralmente diferentes de la enzima farnesiltransferasa, lovastatina y PD152440. El tratamiento de hepatocitos con estos inhibidores, no altera los niveles de ARNm del ALA-S1 basal e inducido por PB, sin embargo, bloquean completamente la represión por insulina de la transcripción del gen del ALA-S1 (Scassa *et al.*, 2001).

Cuando las células HepG2 son transfectadas con un gen reporte ALAS/CAT y co-transfectadas con diferentes cantidades de vectores de expresión para las proteínas dominantes-negativas SOS, Ras y Raf, no se observa ningún efecto sobre la expresión basal del gen reporter a las concentraciones de plásmidos ensayadas. Sin embargo, revierten la represión de la actividad del promotor del ALA-S1 mediada por insulina (Scassa *et al.*, 2001).

En mamíferos, las isoenzimas de la proteína pp90^{RSK}, codificadas por genes diferentes, son fosforiladas y activadas *in vivo* por las MAPKs. Estas proteínas participan en la regulación de la supervivencia y proliferación celular y se encuentran al final de la cascada de señalización mediada por las MAPKs (Scassa *et al.*, 2001). Aunque pp90^{RSK} es citoplasmática, luego de la estimulación puede traslocarse al núcleo donde fosforila una variedad de substratos incluyendo factores de transcripción (Richards *et al.*, 1999). La cotransfección de las células HepG2 con una pp90^{RSK2} constitutivamente activa provocó una disminución en la actividad del promotor del ALA-S1 que fue mayor luego del tratamiento con insulina y es parcialmente revertida por el tratamiento con wortmanina, el inhibidor de PI3K. Por el contrario, la co-transfección con la forma salvaje no mostró un efecto significativo sobre la actividad basal del promotor ALAS/CAT ni sobre la inhibición por insulina. Estos datos sugieren que ambas vías deben estar funcionalmente activas para producir la inhibición de la actividad del promotor del ALA-S1 mediada por pp90^{RSK2} (Scassa *et al.*, 2001).

3.3. Bibliografía

- ✓ Braidotti G., Borthwick I. & May B. (1993). Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinic acid synthase from rat. *J. Biol. Chem.* **268**: 1109-1117.
- ✓ Cable E., Miller T. & Isom H. (2000) Regulation of heme metabolism in rat hepatocytes and hepatocyte cell lines: delta-aminolevulinic acid synthase and heme oxygenase are regulated by different heme-dependent mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* **384(2)**: 280-295.
- ✓ Furuyama K., Kaneko K. & Vargas P. (2007) Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku. J. Exp. Med.* **213(1)**: 1-16.
- ✓ Granick S. & Sassa S. (1971) δ -Aminolevulinic acid synthetase and the control of heme and chlorophyll synthesis. *Metabolic Regulation.* **5**: 77-141.
- ✓ Giono L., Varone C. & Cánepa E. (2001) 5-Aminolaevulinic acid synthase gene promoter contains two cAMP-response elements (CRE)-like sites that confer positive and negative responsiveness to CRE-binding protein (CREB). *Biochem. J.* **353(2)**: 307-316.
- ✓ Gotoh S., Nakamura T., Kataoka T. & Taketani S. (2011) Egr-1 regulates the transcriptional repression of mouse δ -aminolevulinic acid synthase 1 by heme. *Gene.* **472(1-2)**: 28-36.
- ✓ Guberman A., Scassa M., Giono L., Varone C. & Cánepa E. (2003) Inhibitory effect of AP-1 complex on 5-aminolevulinic acid synthase gene expression through sequestration of cAMP-response element protein (CRE)-binding protein (CBP) coactivator. *J. Biol. Chem.* **278(4)**: 2317-2326.
- ✓ Guberman A., Scassa M. & Cánepa E. (2005) Repression of 5-aminolevulinic acid synthase gene by the potent tumor promoter, TPA, involves multiple signal transduction pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* **436(2)**: 285-296.

- ✓ Handschin C., Lin J., Rhee J., Peyer A., Chin S. (2005) Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1 α . *Cell*. **122(4)**: 505-515.
- ✓ Li D. (2005) PGC- α : looking behind the sweet treat for porphyria. *Cell*. **122(4)**: 487-489.
- ✓ Nakajima T., Fukamizu A., Takahashi J., Gage F., Fisher T. (1996) The signal-dependent coactivator CBP is a nuclear target for pp90^{RSK}. *Cell*. **(86)**: 465-474.
- ✓ Richards S., Fu J., Romanelli A., Shimamura A. & Blenis J. (1999). Ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) activation requires signals dependent on and independent of the MAP kinase ERK. *Curr. Biol.* **(9)**: 810-820.
- ✓ Scassa M., Varone C., Montero L. & Cánepa E. (1998) Insulin inhibits delta-aminolevulinate synthase gene expression in rat hepatocytes and human hepatoma cells. *Exp. Cell. Res.* **244(2)**: 460-469.
- ✓ Scassa M., Guberman A., Varone C. & Cánepa E. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for the regulation of 5-aminolevulinate synthase gene expression by insulin. *Exp. Cell. Res.* **271(2)**: 201-213.
- ✓ Scassa M., Guberman A., Ceruti J. & Cánepa E. (2004) Hepatic nuclear factor 3 and nuclear factor 1 regulate 5-aminolevulinate synthase gene expression and are involved in insulin repression. *J. Biol. Chem.* **279(27)**: 28082-28092.
- ✓ Thunell S. (2006) (Far) Outside the box: genomic approach to acute porphyria. *Physiol. Res.* **55(2)**: S43-S66.
- ✓ Watt A., Garrison W. & Duncan S. (2003) HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology*. **(37)**: 1249-1253.

Capítulo 4

FERROQUELATASA

4.1. Descripción general

La ferroquelatasa (FQ) (protohemo ferroliasa EC 4.99.1.1) es la última enzima de la vía biosintética del hemo. Cataliza la inserción de un hierro ferroso (Fe^{2+}) en el anillo de su sustrato, la protoporfirina IX, para formar el protohemo IX (hemo) (Ferreira, 1999).

La FQ se expresa en todos los tejidos aunque se ha observado que la distribución relativa de la proteína y del ARNm es diferente. La proteína es más abundante en el hígado y en las células eritropoyéticas diferenciadas mientras que los niveles de ARNm son mayores en el bazo que en el hígado (Chan *et al.*, 1993).

En humanos el gen de la FQ se encuentra localizado en el cromosoma 18q21.3. Varias mutaciones de este gen se han asociado con la protoporfiria eritropoyética (PPE), enfermedad que se caracteriza por una disminución en la actividad de la enzima que lleva a una acumulación de su sustrato, la protoporfirina IX (Tugores *et al.*, 1994).

La FQ eucarionte es un homodímero localizado en la membrana interna mitocondrial cuyo sitio activo está del lado de la matriz. Es sintetizada en el citoplasma como un precursor de aproximadamente 47 kDa, con una secuencia en la región amino-terminal que la dirige a la organela (Ferreira, 1999; Dailey *et al.*, 2000).

Su forma mitocondrial madura es un homodímero cuyos monómeros pesan aproximadamente 42 kDa. (Dailey *et al.*, 2000).

El aislamiento del ADNc de ratón y humano reveló en ambos casos la presencia de dos ARNm que difieren en sus extremos 3'. En ambas especies, un único promotor dirige la expresión de la FQ en todos los tejidos (Tugores *et al.*, 1994). Dos sitios de poliadenilación producen dos ARNm de diferente longitud, 2,2 kb y 2,9 kb. La elección entre estos dos sitios de poliadenilación está relacionada con

la expresión de la enzima en las células eritroides y las no eritroides (Dailey *et al.*, 2000). En efecto, se observa una diferencia en la abundancia relativa de estos dos ARNm en los tejidos eritroides y no eritroides. El transcrito de 2,2 kb se expresa más en los tejidos eritroides como el bazo y los reticulocitos en comparación con los tejidos no eritroides que contienen preferentemente el transcrito de 2,9 kb. El predominio del transcrito de 2,2 en los reticulocitos se debería a la ausencia de secuencias ricas en A+U en el 3' UTR del mensajero que cuando se encuentran presentes provocan desestabilización (Chan *et al.*, 1993).

4.2. Ferroquelatasa-Promotor

El promotor de la FQ carece de motivos TATA y CAAT boxes y su región proximal está contenida en una región que presenta islas CpG características (Tugores *et al.*, 1994).

El promotor de la FQ humana contiene elementos regulatorios para el factor de transcripción Sp1 así como para los factores de transcripción eritroides específicos GATA-1 y el factor nuclear eritroide-2 (NF-E2) responsables de la expresión basal de la FQ en las células y en los eritrocitos, respectivamente (Tugores *et al.*, 1994).

La región regulatoria 5' del gen de la FQ de ratón contiene sitios de unión para GATA y Sp1, sin embargo, carece de un sitio de unión para NF-E2. Tanto la FQ humana como la murina contienen 3 sitios de unión a Sp1 (Taketani *et al.*, 1999).

También se encontró que el factor nuclear hepático-1 α (HNF-1 α) es capaz de activar en trans el promotor de la FQ, en una forma tipo celular y tejido específica. (Muppala *et al.*, 2000).

4.2.1. Factor de transcripción Sp1

Sp1 es un factor de transcripción que contiene dedos de zinc y se expresa ubicuamente, tiene un peso molecular que se encuentra entre los 100 a 110 kDa. Puede activar o reprimir la transcripción de distintos genes en respuesta tanto a estímulos fisiológicos como patológicos (Tan & Khachigian, 2009).

Los sitios de unión de Sp1 se encuentran ampliamente distribuidos en los promotores ricos en GC que carecen de TATA box y compensan funcionalmente su ausencia (Tan & Khachigian, 2009).

Sp1 se somete a cambios dinámicos en su fosforilación, O-GlcNac glicosilación, SUMOilación y acetilación. Estas modificaciones post traduccionales regulan su compartimentalización intracelular e interacción con otros factores de transcripción. La actividad de Sp1 está controlada por al menos ocho sitios de O-glicosilación. Las O-N-acetil glucosamina (O-GlcNac) se unen reversiblemente a residuos Ser y Thr de Sp1. Mientras que cinco sitios de O-GlcNac en el dominio de unión al ADN aumentan su actividad transcripcional, al menos dos sitios de O-GlcNac en uno de los dominios de activación de la región N-terminal reducen su potencial de trans activación, inhibiendo la interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción (Issad & Kuo, 2008).

Estudios realizados en células de hepatoma de rata mostraron que la glicosilación es crítica para su localización nuclear y una vez en el núcleo también puede ser fosforilado. La fosforilación de Sp1 influye tanto positiva como negativamente en su actividad transcripcional ya que puede alterar su unión al ADN (Issad & Kuo, 2008).

4.3. Ferroquelatasa-Clúster de hierro-azufre

Las mitocondrias son las principales organelas celulares que consumen hierro y entre sus funciones se encuentra el mantenimiento de la homeostasis del mismo. El hierro es importado a la mitocondria por la mitoferrina y posteriormente ensamblado en los clúster de hierro-azufre [Fe-S] y en el hemo (Ye & Rouault, 2010).

Los clúster de Fe-S son cofactores que se encuentran ligados a los residuos cisteína de algunas proteínas facilitando numerosos tipos de reacciones. Están compuestos por hierro y azufre inorgánico y generalmente contienen cuatro átomos de hierro y cuatro de azufre. Los clúster de Fe-S son muy versátiles químicamente, debido a que tanto el hierro como el azufre pueden donar o aceptar varios electrones (Rouault, 2012).

La FQ posee un clúster [2Fe-2S] que le permite la homodimerización (Taketani *et al.*, 2003).

En la FQ de mamíferos, el clúster [2Fe-2S] se encuentra en su extremo carboxi-terminal. Cuando la enzima humana está mutada en la región C-terminal o carece de ella (Taketani *et al.*, 2003) pierde completamente su actividad dando lugar a la manifestación de la PPE en humanos (Crooks *et al.*, 2010).

En mamíferos, la expresión y la actividad enzimática a nivel post-traducciona l de la FQ están reguladas por la concentración intracelular de hierro a través del clúster [2Fe-2S] (Taketani *et al.*, 2003). Cuando células Cos7 transfectadas con un plásmido conteniendo la enzima fueron tratadas con concentraciones crecientes de hierro se observó un aumento progresivo en la actividad de la FQ (Taketani *et al.*, 2000). Cuando el nivel de hierro intracelular es bajo o cuando se encuentra presente el óxido nítrico, el clúster se desarma provocando una disminución en la síntesis del hemo (Taketani *et al.*, 2003).

En experimentos realizados con células MEL, se demostró que la vida media de la enzima sintetizada *de novo* se redujo de 35 horas en las células normales, a menos de 1 hora en las deficientes en hierro. Luego de la depleción de hierro no se observaron cambios en la abundancia de la proteína madura. Esto sugiere que durante una deficiencia de hierro la FQ madura mitocondrial que contiene el clúster [2Fe-2S] no es susceptible de ser degradada, mientras que la apoproteína sintetizada *de novo* es rápidamente degradada en ausencia de hierro disponible (Crooks *et al.*, 2010).

4.4. Bibliografía

- ✓ Chan R., Schulman H. & Ponka P. (1993) Expression of ferrochelatase mRNA in erythroid and non-erythroid cells. *Biochem. J.* **292**(Pt 2): 343-349.
- ✓ Crooks D., Ghosh M., Haller R., Tong W. & Rouault T. (2010) Post translational stability of the heme biosynthetic enzyme ferrochelatase is dependent on iron availability and intact iron-sulfur cluster assembly machinery. *Blood.* **115**(4): 860-869.
- ✓ Dailey H., Dailey T., Wu C., Medlock A., Wang K. *et al.* (2000) Ferrochelatase at the millennium: structures, mechanisms and [2Fe-2S] clusters. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**(13-14): 1909-1926.
- ✓ Ferreira G. (1999) Ferrochelatase. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **31**(10): 995-1000.
- ✓ Issad T. & Kuo M. (2008) O-GlcNac modification of transcription factors, glucose sensing and glucotoxicity. *Trends. Endocrinol. Metab.* **19**(10): 380-389.
- ✓ Muppala V., Lin C. & Lee Y. (2000) The role of HNF-1alpha in controlling hepatic catalase activity. *Mol. Pharmacol.* **57**(1): 93-100.
- ✓ Rouault T. (2012) Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis. Model. Mech.* **5**(2): 155-164.
- ✓ Taketani S., Mohri T., Hioki K., Tokunaga R. & Kohno H. (1999) Structure and transcriptional regulation of the mouse ferrochelatase gene. *Gene.* **227**(2): 117-124.
- ✓ Taketani S., Adachi Y. & Nakahashi Y. (2000) Regulation of the expression of human ferrochelatase by intracellular iron levels. *Eur. J. Biochem.* **267**(15): 4685-4692.
- ✓ Taketani S., Kakimoto K., Ueta H., Masaki R. & Furukawa T. (2003) Involvement of ABC7 in the biosynthesis of heme in erythroid cells: interaction of ABC7 with ferrochelatase. *Blood.* **101**(8): 3274-3280.

- ✓ Tan N. & Khachigian L. (2009) Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **29(10)**: 2483-2488.
- ✓ Tugores A., Magness S. & Brenner D. (1994) A single promoter directs both housekeeping and erythroid preferential expression of the human ferrochelatase gene. *J. Biol. Chem.* **269(49)**: 30789-30797.
- ✓ Ye H. & Rouault T. (2010) Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry.* **49(24)**: 4945-4956.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Objetivo general

El objetivo del presente trabajo es avanzar en el esclarecimiento de las vías que participan en la interrelación descrita entre el metabolismo de los hidratos de carbono y la regulación de la biosíntesis del hemo, con el propósito de elaborar nuevas y/o más eficaces terapias para el manejo de las porfirias agudas.

2. Objetivos particulares

En base a la hipótesis de que la glucosa podría participar en la regulación de la vía biosintética del hemo directamente o a través de las hormonas (insulina y glucagon) involucradas en el metabolismo de los hidratos de carbono se generará y caracterizará un modelo murino de diabetes *mellitus* tipo 1 que permita estudiar esta relación.

En el hígado de los ratones diabéticos se estudiarán los efectos de la insulina y del agente insulino-mimético vanadato sobre la delta-aminolevulinato sintetasa-1 (ALA-S1), primera enzima y regulatoria de la vía biosintética del hemo

Asimismo, se evaluará la participación de la vía de señalización de la insulina en la regulación de la transcripción del ALA-S1.

Se estudiará y caracterizará en este modelo, a la ferroquelatasa (FQ), última enzima del camino del hemo, debido a que se la ha considerado como otro posible punto de regulación de esta vía.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

Capítulo 1

MATERIALES

1.1. Equipos

Las centrifugaciones se efectuaron en una centrífuga refrigerada HERMLE Z383K (Hermle Labortechnik GmbH) y en centrífugas Eppendorf® Minispin® (Sigma-Aldrich)

Los homogenatos se prepararon con un homogeneizador ULTRA-TURRAX Janke & Kunkel (IKA-Labortechnik, Staufen, Germany) ó en un homogeneizador POTTER S (B. Braun, Melsungen AG, Germany).

La sonicación de las muestras se llevó a cabo utilizando un sonicador Heat Systems Ultrasonics W-185D.

Las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro HEWLETT PACKARD modelo HP8452 A (Hewlett Packard Company, San José, CA 95122, USA) y un espectrofotómetro DeNovix DS-11/DS-11+.

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando un Instrumento Step One™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) y los resultados fueron analizados con el programa Step One™ Software Versión 2.3 (Applied Biosystems).

Las cuantificaciones de las placas radiográficas se llevaron a cabo utilizando el programa Scion Image para Windows.

1.2. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico, provenientes de Merck o Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO). El metavanadato de sodio fue adquirido en Sigma.

1.3. Sondas

Para la cuantificación de los distintos ARNm se utilizaron las siguientes sondas:

- a) delta-aminolevulinato sintetasa 1 (ALA-S1): Fragmento EcoRI-EcoRI (1972pb) correspondiente al ADNc de delta-aminolevulinato sintetasa hepática de rata, inserto en el plásmido pKRA2c, gentilmente cedido por el Dr. Masayuki Yamamoto Dpt. Of Biochemistry, Toyama Medical and Pharmaceutical University, School of Medicine, Toyama, Japan.
- b) Ferroquelatasa (FQ): se diseñaron los siguientes primers que amplificaron un fragmento de 926pb Fw 5'GACCGAGACCTCATGACACTTC3'; Rev 5'GACAGTTCAGACTCAACTGCGTGGAGC3'
- c) 18S: se diseñaron los siguientes primers que amplificaron un fragmento de 1863pb Fw 5'GGTTGATCCTGCCAGTAGCATA3'; Rev 5'AATGATCCTTCCGCAGGTTC3'

1.4. Anticuerpos

Para las determinaciones por Western Blot e inmunohistoquímicas se utilizaron los siguientes anticuerpos: Anticuerpos primarios ALA-S1 diseñado en nuestro laboratorio; FQ cedido gentilmente por el Dr. Shigeru Taketani Department of Biotechnology, Kyoto Institute of Technology, Japan.; IRS1, pIRS1, Akt, pAkt, CREB, pCREB, FOXO1, PGC-1 α , Erk1/2, pErk1/2, NRF-1, Sp1, insulina, glucagon, anticuerpos secundarios anti rabbit, anti mouse y anti donkey de Santa Cruz Biotechnology; O-GlcNac monoclonal (CTD 110.6) cedido amablemente por el Dr G. Hart, de la The Johns Hopkins University, Baltimore, MD e IgM de Sigma Aldrich.

Capítulo 2

DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1. Animales

Se utilizaron ratones machos adultos de la cepa CF1 con un peso de aproximadamente 30-35 g que fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura e iluminación. Dispusieron *ad libitum* de agua y alimento.

Los animales fueron tratados según las normas establecidas por el comité de la Asociación Argentina de Especialistas en Animales de Laboratorio (AADEAL).

2.2. Tratamientos

Se realizaron los siguientes tratamientos:

- **Diabéticos (STZ):** los animales fueron diabetizados con una única dosis de estreptozotocina (STZ) (170 mg/kg, *i.p.* disuelto en buffer citrato de Na 0,1 M, pH 4,5). A los 16 días post inyección, se determinó la glucemia en una muestra de sangre obtenida de la cola (Glucostix Bayer Diagnosticos). Los animales con un valor mayor a 300 mg/dl fueron considerados diabéticos.
- **Diabéticos tratados con insulina (STZ+I):** los animales diabéticos una vez confirmada la diabetes, fueron inyectados una vez al día (10:00 horas) con insulina humana Insuman® N (30 U/100 g, *s.c.*) durante 16 días.
- **Diabéticos tratados con vanadato (STZ+V):** el vanadato, un conocido agente insulino-mimético, fue administrado en el agua de bebida (0,3 mg/ml) durante 16 días comenzando inmediatamente después de confirmada la diabetes.
- **Controles (C):** los animales recibieron el vehículo correspondiente a cada tratamiento.

Todos los grupos fueron sacrificados a los 0, 4, 8, 16, 32, 42 días posteriores a haber sido inyectados con STZ.

Capítulo 3

DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

3.1. Determinación de ALA y PBG urinarios

La determinación se realizó según el método de Mauzerall & Granick (1956). Se utilizaron resinas de intercambio iónico compactadas en columnas (0,8 x 3,0 cm). Para la separación del PBG se empleó la resina aniónica Dowex 2X-8 en la forma acetato y para el ALA, la resina catiónica Dowex 50X-8 en la forma ácida.

3.1.1. Recolección de la muestra de orina

Para la recolección de las muestras de orina los ratones fueron colocados en jaulas metabólicas (1 ratón por jaula) durante 24 horas. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura e iluminación.

3.1.2. Separación de ALA y PBG

Se sembró 1 ml de orina (pH entre 5 y 7) en la columna Dowex 2X-8 en la forma acetato. Luego se lavó 2 veces con 2 ml de agua destilada cada vez. Todo el eluido se recogió en un tubo (T_A). El PBG retenido en la columna se recuperó eluyéndolo con 7 ml de ácido acético 1 M.

El primer eluido de la columna (T_A), que contiene ALA y urea, se sembró en la columna Dowex 50X-8 en la forma ácida. Se lavó con 16 ml de agua destilada para eliminar la urea y luego se eluyó el ALA con 7 ml de acetato de sodio 0,5 N.

3.1.3. Determinación colorimétrica de ALA y PBG

La determinación del ALA urinario se basa en la capacidad que tienen todas las aminoacetonas de condensarse con acetilacetona a pH 4,6 dando lugar a la formación de un pirrol con una posición alfa libre.

Para la formación del pirrol a partir de ALA se procedió de la siguiente forma: 1 ml de solución que contiene ALA se mezcló con 1 ml de buffer acetato 1 M pH 4,6 y 0,05 ml de acetilacetona y se calentó durante 10 minutos a 100 °C para producir la condensación. Luego de enfriar, se mezclaron volúmenes iguales de la solución conteniendo el pirrol y el reactivo de Ehrlich. A los 8 minutos de agregado el reactivo se leyó la absorbancia (A) a 555 nm en un espectrofotómetro.

En estas condiciones, la cantidad de ALA presente se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\text{mg ALA/24h} = A^{555} \times V_t \times 0,00385 \times V_{24h}$$

donde: V_t = volumen del tubo (ml)

V_{24h} = diuresis (ml)

0,00385 = factor aplicable correspondiente a la absorción de una solución de ALA de 1 mg/ml tratada en las condiciones descriptas.

La determinación de PBG se basa en su reacción con el p-dimetilaminobenzaldehído (p-DMAB), en medio ácido, para dar un compuesto de color rojizo.

La técnica empleada (Moore & Labbe, 1964) consistió en mezclar volúmenes iguales de muestra y reactivo de Erlich a temperatura ambiente. Luego de la adición del reactivo, el máximo desarrollo de color se alcanza a los 8 minutos, manteniéndose constante hasta los 15 minutos, momento en que la reacción comienza a decaer. El cálculo de PBG se realizó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{mg PBG/24h} = (A^{555} \times \text{dilución} \times V_t \times V_{24h})/113,6$$

dónde: V_t = volumen del tubo (ml)

V_{24h} = diuresis (ml)

113,6 = absorción de una solución de PBG en ácido acético

es decir : $E^{1\text{ cm}}_{1\%} = 113,6$

$E^1_{1\text{ mM}} = 25600$ (Cookson & Rimington, 1954)

De acuerdo con este método, la mínima cantidad detectable de PBG es 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ($A^{555} = 0,0113$).

3.2. Cuantificación de glucosa

Para la cuantificación de glucosa en suero se utilizó el Kit Glicemia de Wiener lab. Wiener Laboratorios S.A.I.C. (método enzimático). Las determinaciones se realizaron según las instrucciones del fabricante.

3.3. Cuantificación de insulina

Para la cuantificación de insulina en suero se utilizó el Rat Insulin Radioimmunoassay (RIA) Kit de LINCO Research. Las determinaciones se realizaron según las instrucciones del fabricante.

3.4. Determinación de la concentración de proteínas

El contenido proteico se determinó empleando el método descrito por Lowry *et al.* (1951) y /o el de Bradford (1976).

3.5. Cuantificación de AMPc

Para la cuantificación del AMPc, el tejido fue rápidamente homogeneizado en etanol frío y luego centrifugado durante 15 minutos a 1.200 g. El sobrenadante fue evaporado y el residuo fue resuspendido en Tris-HCl 50 mM pH 7,4; BSA 0,1 %. El contenido de AMPc fue determinado por la competencia del [³H] AMPc por la PKA, según la descripción de Davio *et al.* (1995).

Los resultados se expresaron en picomoles de AMPc por miligramo de proteína.

3.6. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron aplicando el análisis de varianza para una variable (ANOVA), el test de Tukey o Dunnett, utilizando el Software GraphPad InStat tm 2.0.

3.7. Bibliografía

- ✓ Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- ✓ Cookson G. & Rimington C. (1954) Porphobilinogen. *Biochem. J.* **57(3)**: 476-484.
- ✓ Davio C., Cricco G., Bergoc R. & Rivera E. (1995) H1 and H2 histamine receptors in N-nitroso-N-methylurea (NMU)-induced carcinomas with atypical coupling to signal transducers. *Biochem. Pharmacol.* **50(1)**: 91-96.
- ✓ Lowry O., Rosebrough N., Farr A. & Randall R. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- ✓ Mauzerall D. & Granick S. (1956) The occurrence and determination of delta-amino-levulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* **219(1)**: 435-446.
- ✓ Moore D. & Labbe R. (1964) A quantitative assay for urinary porphobilinogen. *Clin. Chem.* **10**: 1105-1111.

Capítulo 4

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.1. Determinación de la vida media del ARNm del ALA-S

Los animales controles y los diabéticos fueron inyectados con α -amanitina (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) vía *i.p.* y fueron sacrificados a los 0, 10, 20, 30, 45 y 60 minutos posteriores a la aplicación de la misma. Se aisló el ARN total hepático y se analizó por Northern blot.

4.2. Extracción del ARN total

La extracción se realizó en cinco etapas de acuerdo con el método de Chomczynsky & Sacchi (1987).

El tejido (200 mg de hígado) se homogeneizó en 2 ml de una solución desnaturante (tiocianato de guanidina 4 M; citrato de sodio 25 mM pH 7; β -mercaptoetanol 0,1 M y lauril sarcosina 0,5 % v/v).

La extracción del ARN se realizó por el agregado secuencial de acetato de sodio 2 M pH 4, un volumen de fenol saturado en agua y cloroformo-alcohol isoamílico (49:1, v/v). Luego de agitar, se incubó 15 minutos a 4 °C y se centrifugó 20 minutos en frío a 10.000 g.

El ARN contenido en la fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol durante una hora a -20 °C y centrifugó a 4 °C durante 20 minutos a 10.000 g.

El pellet de ARN se resuspendió en 600 μl de solución desnaturante y se repitió la etapa 3.

El precipitado se lavó dos veces con 800 μl de etanol 75 %, realizando dos centrifugaciones en frío de 5 minutos a 10.000 g. El pellet final se secó al vacío y luego se resuspendió en agua libre de RNAsas. El material resultante se cuantificó y guardó inmediatamente a -70 °C.

4.3. Cuantificación de los ácidos nucleicos

La cuantificación de ADN y ARN se realizó por absorbancia a 260 nm, considerando que una unidad de D.O. equivale a 50 µg/ml de ADN de doble cadena o 40 µg/ml de ARN. En ambos casos se midió la absorbancia a 280 nm y se determinó la relación 260/280 como índice de pureza. Se consideró como un índice de pureza adecuado un cociente de 1,7-2.

4.4. Obtención del ADNc de las sondas

4.4.1. Preparación de las células competentes

Se repicó una colonia de *Escherichia coli* JM109 crecida en medio M9 (Na₂HPO₄ 6 g/l; KH₂PO₄ 3 g/l; NaCl 0,5 g/l; NH₄Cl 1 g/l; agar 15 g/l pH 7,4; MgSO₄ 2 mM; CaCl₂ 0,1 mM; glucosa 0,2 % y tiamina-HCl 1 mM) y se creció toda la noche en 5 ml de medio LB (peptona 1 %; NaCl 1 %; extracto de levadura 0,5 % pH 7,5) a 37 °C. Luego se diluyó 0,5 ml de medio de cultivo crecido con 50 ml de medio fresco y se dejó crecer hasta fase exponencial (DO_{600 nm} = 0,375). Se cosecharon las células por centrifugación (5 minutos a 7.000 g a 4 °C). El pellet se resuspendió en 10 ml de una solución de CaCl₂ (CaCl₂ 60 mM; glicerol 15 %; Tris-HCl 1 M pH 7) y luego de incubar 15 minutos en hielo se centrifugó nuevamente (5 minutos a 7.000 g a 4 °C). Posteriormente el pellet se resuspendió en 2 ml de CaCl₂ 0,1 M y se incubó 1 hora en hielo. Las células competentes se guardaron a -70 °C.

4.4.2. Transformación de las células competentes

Se pusieron en contacto 100 µl de suspensión de células competentes con 10 ng de ADN plasmídico resuspendido en 10-25 µl, durante 10 minutos en hielo. Luego se incubó 2 minutos a 42 °C y 5 minutos en hielo. Se agregó 1 ml de medio LB fresco y se incubó 1 hora a 37 °C. Finalmente se sembró en medio LB sólido con el antibiótico correspondiente y se dejó crecer a 37 °C durante 16 horas.

4.4.3. Separación del plásmido

Se tomó una de las colonias transformadas, se sembró en 5 ml de medio LB en presencia del antibiótico indicado en cada caso y se dejó crecer con agitación a 37 °C durante toda la noche.

Las células se cosecharon por centrifugación a 4.000 g por 10 minutos a 4 °C. El método de extracción utilizado fue el de la lisis alcalina de Birnboim & Doly (1979). El pellet se resuspendió en solución de lisis (lisosima 4 mg/ml; Tris-HCl 25 mM pH 8; EDTA 10 mM pH 8 y glucosa 50 mM) y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó solución de NaOH/SDS (NaOH 0,2 N; SDS 1 %). Después de una incubación de 5 minutos a 0 °C se agregó solución de acetato de potasio pH 4,8 (acetato de potasio 5 M y el pH se ajustó a 4,8 con ácido acético), se mezcló por inversión y se dejó reposar a 0 °C por 5 minutos para luego centrifugar a 10.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le agregó un volumen igual de fenol-cloroformo y se centrifugó 2 minutos a 10.000 g. A la fase acuosa se le agregó 2 volúmenes de etanol absoluto, se dejó reposar por 2 minutos y se centrifugó 5 minutos a 10.000 g. Finalmente se precipitó con etanol y el pellet resultante se resuspendió en buffer TE conteniendo ARNasa pancreática (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8 y ARNasa pancreática 20 µg/ml).

4.4.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las muestras de ADN se corrieron en geles de agarosa al 1 % en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7, conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. El buffer de siembra utilizado contenía 0,025 % azul de bromofenol y 10 % glicerol.

El buffer de corrida utilizado fue fosfato de sodio 10 mM pH 7 y la electroforesis se llevó a cabo en un campo eléctrico de 5 V/cm.

4.4.5. Aislamiento de la sonda inserta en el plásmido

Los plásmidos se clivaron utilizando enzimas de restricción, de manera tal de liberar los fragmentos que luego serían utilizados como sonda. El producto de la

reacción se corrió en un gel de agarosa LMP (bajo punto de fusión) conteniendo 0,05 µg/ml de bromuro de etidio. La banda correspondiente al inserto se separó del gel, se disolvió en agua bidestilada (3 ml/g de gel) y se calentó a 65 °C para fundir la agarosa. Esta solución se utilizó para marcar la sonda empleando un Kit comercial (Oligolabelling Kit de Bio-Labs).

4.4.6. Preparación de la sonda radioactiva

La marcación radioactiva de los fragmentos de ADN utilizados como sonda se llevó a cabo por el método de Random Priming utilizando el Oligolabelling Kit de Bio-Labs. La reacción se realizó según las instrucciones del fabricante, utilizando 1 µCi de ($\alpha^{32}\text{P}$) dCTP por µg de ADN.

4.5. Northern blot

4.5.1. Electroforesis de ARN en geles de agarosa

El ARN total de cada muestra, 20 µg/calle, se corrió en geles de agarosa al 1 % en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7 y formaldehído deionizado 2,2 M. Antes de sembrarse en gel, el ARN se desnaturalizó en buffer de siembra (formamida deionizada 50 %; formaldehído 2,2 M; buffer fosfato 10 mM pH 7; bromuro de etidio 25 µg/ml; glicerol 10 %; azul bromofenol 0,1 %) a 65 °C durante 5 minutos.

Fue utilizado como buffer de corrida fosfato de sodio 10 mM pH 7. La electroforesis se llevó a cabo en una cuba de electroforesis horizontal HORIZON aplicando un campo eléctrico de 5 V/cm.

4.5.2. Transferencia del ARN a membranas de nylon

La transferencia del ARN del gel de agarosa a la membrana de nylon se llevó a cabo en forma pasiva. El gel fue lavado dos veces en SSC 20X (NaCl 3 M; citrato de sodio 0,3 M pH 7) durante 20 minutos y la membrana de nylon 10 minutos en agua y otros 10 minutos en SSC 20X. Se colocó el gel sobre una banda de papel

Whatman 3 MM del mismo ancho que el gel pero más larga. El papel con el gel encima se apoyó sobre una plataforma en el interior de una bandeja conteniendo 600 ml de la solución de transferencia (SSC 20X), de manera que sólo los extremos del papel tocaran la solución. Posteriormente se apoyó sobre el gel la membrana de nylon y se cubrió la superficie no ocupada por la membrana con parafilm para que toda la solución pasara a través del nylon y aumentara de esta manera la eficiencia de la transferencia. A continuación se apiló sobre la membrana de nylon 3 hojas de papel Whatman 3 MM humedecidas con la solución de transferencia, 8 cm de papel absorbente seco y por último un vidrio sobre el cual se apoyó un peso de 1 kg. La transferencia se realizó en todos los casos por un período de 15 horas. Una vez finalizada la transferencia, el entrecruzamiento del ARN a la membrana se realizó utilizando un UV Stratalinker 1800.

4.5.3. Hibridización

Las membranas de nylon se pre-incubaron en un horno de hibridización con 1 ml de solución (formamida 50 %; SSPE 5X; esperma de salmón 0,25 mg/ml; solución Denhardt's 2X y SDS 1 %) cada 10 cm² de membrana a hibridizar durante 4 horas a 42 °C. Después de la prehibridización, la solución se reemplazó por un volumen igual de la misma conteniendo la sonda marcada en una concentración de 10⁶ cpm/ml. En todos los casos la sonda se hirvió durante 5 minutos de manera tal de disociar las cadenas complementarias. La incubación con la sonda se realizó durante 12 horas. Posteriormente se retiró la solución de hibridización y se comenzaron a realizar los lavados.

Se llevaron a cabo dos lavados de 15 minutos cada uno con una solución SSC 2X; SDS 0,1 % a temperatura ambiente y a continuación se hicieron lavados de 15 minutos cada uno con una solución SSC 1X; SDS 0,1 % a 45 °C. Se siguió la eficiencia de los lavados mediante la medición de radiactividad en los filtros con un contador Geiger-Muller hasta obtener una relación señal/ruido adecuada.

4.5.4. Exposición radiográfica

Para obtener la imagen de hibridización, se expusieron estas membranas de nylon, previamente recubiertas con un film, a placas radiográficas AGFA. En todos los casos la exposición se realizó a -70 °C y el tiempo de la misma dependió de la cantidad de radiación emitida por la membrana.

4.5.5. Cuantificación de las señales de hibridización

Las autorradiografías se cuantificaron en unidades relativas de scanner. Los resultados se expresan como el porcentaje del valor control promedio, tomado como 100 %.

4.6. Western blot

4.6.1. Preparación homogenatos

4.6.1.1. Homogenato total

El homogenato del tejido se realizó en buffer homogenato (Triton 1 %; Tris-HCl 100 mM pH 7,4; $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 100 mM; NaF 100 mM; EDTA 10 mM; cocktail inhibidor de proteasas SIGMA P8340) en una dilución 1:10. Se centrifugó una vez a 10.000 rpm durante 30 minutos y se descartó el pellet. El sobrenadante se fraccionó y guardó a -70 °C.

4.6.1.2. Homogenato núcleos

Se realizó un homogenato del tejido en buffer 10 mM Tris-HCl pH 7,6 conteniendo inhibidores de proteasas en una dilución 1:8. Se centrifugó una vez a 500 rpm. Se descartó el pellet. El sobrenadante se centrifugó durante 5 minutos a 3.000 rpm. El pellet obtenido correspondiente a la fracción nuclear se resuspendió en 0,5 ml de buffer homogenato. Se fraccionó y guardó a -70 °C. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976).

4.6.2. SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Se prepararon geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), de distinto porcentaje de acuerdo a la proteína estudiada. Las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 100 °C en una relación 1:1 (v/v) en buffer de siembra (1 ml glicerol; 0,5 ml β -mercaptoetanol; 3,0 ml SDS 10 %; 1,25 ml Tris-HCl 1 M pH 6,7; 1 mg azul bromofenol). La corrida electroforética se realizó en una cuba de electroforesis Hoefer mini VE, Amersham Pharmacia Biotech en buffer de electroforesis 1X (3 g Tris base; 14,4 g glicina; 10 ml SDS 10 %; pH 8,3; volumen final 1 litro). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante en un rango de 100-250 V, no excediendo los 300 V. Se consideró la corrida finalizada cuando el frente de corrida alcanzó la base del gel.

En la leyenda de cada figura se especifican el porcentaje del gel utilizado y la cantidad de proteína sembrada.

4.6.3. Transferencia

Luego de la corrida electroforética, el gel de resolución se sumergió en buffer de transferencia o Towbin-buffer (3,0 g Tris base; 14,4 g glicina; metanol 20 % (v/v); pH 8,3; volumen final 1 litro) durante 5 minutos. La transferencia se realizó sobre membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL Amersham). La membrana se pre-humedeció en agua destilada y posteriormente en buffer Towbin durante 10 minutos. El cassette de electroblotting se armó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se transfirió en Towbin-buffer a voltaje constante (35 V) durante 45 minutos. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se dejó secar al aire, se colocó entre dos papeles Whatman y se guardó envueltos en papel film a 4 °C.

4.6.4. Inmunodetección

Las membranas se humedecieron en TBS-T 1X 0,2 % (2 ml Tween 20; 2,42 g Tris base; 8,0 g NaCl, se ajustó el pH a 7,6 con HCl 5N; volumen final 1 litro) durante 10 minutos a temperatura ambiente y para confirmar la transferencia se

tiñeron con rojo ponceau (Ponceau 0,1 % en ácido acético 5 % (v/v)). Se bloquearon con BSA 5 %, disuelta en TBS-T 1X 0,2 %, o leche descremada en polvo 5 % disuelta en el mismo medio, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron con TBS-T 1X 0,2 % a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las membranas se incubaron con el primer anticuerpo en la dilución apropiada en TBS-T 1X 0,2 %. Las diluciones se optimizaron para cada anticuerpo por medio de un análisis de dot blot. Los tiempos y las temperaturas de incubación variaron dependiendo del anticuerpo. Se lavaron a temperatura ambiente con TBS-T 1X 0,2 %. El tiempo de lavado dependió de cada anticuerpo. Las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (IgG-HRP Horse-Raddish Peroxidase) 1 hora a temperatura ambiente. La elección del segundo anticuerpo dependió del origen del primero. Se emplearon diluciones en TBS-T 1X 0,2 % que optimizaron la señal y disminuyeron el background. El tiempo de lavado dependió de cada anticuerpo. Para revelar se empleó el sistema de detección de western blot ECL Amersham (Enhanced Chemiluminiscent System), basado en el principio de quimioluminiscencia, compuesto por dos reactivos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Alternativamente la detección se realizó con un método no comercial mezclando 1 ml de Reactivo 1 (luminol 2,5 mM; ácido cumárico 3,9 mM y Tris-HCl 100 mM, pH 8,5) con 1 ml de Reactivo 2 (5 µl de H₂O₂ 30 volúmenes en 1 ml de Tris-HCl 100 mM, pH 8,5) en el momento de usarlo. La mezcla se vertió sobre la membrana y se reveló luego de 1 minuto

Las membranas se expusieron a placas radiográficas AGFA. El tiempo de exposición (desde 1 minuto a 1 hora) dependió de la cantidad de señal emitida.

4.6.5. Cuantificación

Las autorradiografías, se cuantificaron en unidades de scanner relativas. Los resultados se expresaron como el porcentaje del valor control promedio, tomado como 100 %.

4.7. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

4.7.1. Cross-linkado

El tejido (3-6 mg) se cortó en piezas pequeñas y se le agregó 10 ml de PBS 1X y formaldehído 1 %. Se incubó a temperatura ambiente con rotación durante 15 minutos. La reacción se cortó con glicina 2 M (concentración final 0,125 M). Se incubó con rotación 5 minutos a temperatura ambiente. El tejido se lavó 1 vez con PBS 1X en presencia de inhibidores de proteasas y se resuspendió en 1 ml de PBS 1X. Se homogenizó manualmente. El homogenato se centrifugó durante 10 minutos en frío a 3.000 rpm. El pellet se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis celular (Tris-HCl 5 mM pH 8; KCl 85 mM; nonidet P40 0,5 %) y se incubó en hielo durante 15 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 5.000 rpm en frío. El pellet correspondiente a los núcleos se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis nuclear conteniendo (Tris-HCl 50 mM pH 8,1; EDTA 10 mM; SDS 1 %). Se incubó durante 20 minutos en hielo. Se agregó al lisado 0,1 g de esferas de vidrio G-5235 y se sonicó durante 5-7 minutos (intervalos de 30 segundos) para obtener fragmentos de ADN de 300-600 pares de bases. El tamaño de los fragmentos se testeó en gel de agarosa 1 % con bromuro de etidio. El sonicado se guardó a -70 °C para inmunoprecipitar. Todas las soluciones contuvieron un cocktail inhibidor de proteasas SIGMA P8340.

4.7.2. Inmunoprecipitación

El sonicado se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se limpió agregando de 30 µl de beads de agarosa A/G (proteína A/G Plus - Agarosa Santa Cruz Biotechnology) prebloqueadas con esperma de salmón. Se incubó 1 hora con rotación y se centrifugó 5 minutos a 2.500 rpm. El sobrenadante se dividió en volúmenes iguales de 500 µl. Se trabajó en frío y en presencia de inhibidores de proteasas.

A una fracción se le agregó la cantidad de anticuerpo específico. A la otra fracción se la consideró como un control de la posible interacción no específica entre la cromatina y las beads de agarosa A/G (control mock) a la que se le agregó 30 µl de beads de agarosa prebloqueadas con esperma de salmón. Las muestras se dejaron con rotación en frío durante toda la noche.

Para recuperar el complejo formado por el anticuerpo, la proteína y el ADN se agregaron 30 µl de beads de agarosa A/G prebloqueadas con esperma de salmón y se incubó durante 1 hora con rotación en frío. Se centrifugó en frío durante 5 minutos a 2.500 rpm. El sobrenadante del control mock se guardó como control de ADN total.

Los pellet obtenidos (control mock e inmunoprecipitado) se lavaron sucesivamente 1 vez con: buffer de baja salinidad (SDS 0,1 %; triton 100 X 1 %; EDTA 2 mM; NaCl 150 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,1), buffer de alta salinidad (SDS 0,1 %; Triton 100 X 1 %; EDTA 2 mM; NaCl 500 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,1), buffer LiCl (LiCl 250 mM; nonidet P40 1 %; deoxicolato 1 %; EDTA 1 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,1) y 2 veces con buffer TE (EDTA 1 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,1). Cada lavado se realizó por rotación y se centrifugó a 2.500 rpm durante 5 minutos. Se trabajó en frío.

A las beads de agarosa provenientes del último lavado se les agregó 150 µl de buffer de elución (SDS 1 %; NaHCO₃ 100 mM) para recuperar el complejo anticuerpo-proteína-ADN y el pegado inespecífico. Se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos con rotación. Se centrifugaron 5 minutos a 2.500 rpm. Esta operación se repitió una vez más. Se reunieron los eluidos.

A cada tubo, eluido y control, se le agregó 1 µl de RNAasa de alta concentración (10 mg/ml) y NaCl 5 M a una concentración final de 0,3 M para revertir el cross linkeado. Las muestras se incubaron durante 2 horas a 85 °C.

4.7.3. Purificación del ADN

A cada muestra se le agregó 2 veces y media su volumen en etanol 100 % y se dejó precipitando durante toda la noche a -20 °C. Se centrifugó durante 20 minutos en frío a 14.000 rpm. Se eliminó el etanol residual y se dejó secar completamente el pellet al aire. El pellet se disolvió en 300 µl de buffer TE. Se extrajo 1 vez con igual volumen de fenol/cloroformo/isoamílico y una vez con igual volumen de cloroformo/isoamílico. Se trabajó a temperatura ambiente. A la fase acuosa resultante, se le agregó 30 µl de NaCl 5 M y 750 µl de etanol 100 % y se dejó

precipitando durante toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para obtener el pellet se centrifugó en frío durante 20 minutos a 14.000 rpm. Éste se dejó secar al aire y se resuspendió en 30 μl de H_2O autoclavada o buffer TE. Se purificó con QIAquick PCR purification Kit QUIAGEN y se guardó para analizar por PCR.

4.7.4. Bloqueo de las beads de agarosa para inmunoprecipitación

Las beads A/G de agarosa (120 μl) se bloquearon con (2,4 μl) esperma de salmón (10 mg/ml) en frío con rotación durante toda la noche. Se lavaron dos veces con buffer de diálisis 1X (EDTA 2 mM; Tris-HCl 50 mM pH 8; sarkosyl 0,2 %) y cada vez se centrifugaron a 2.000 rpm en frío durante 10 minutos. Finalmente se resuspendieron en buffer de lisis en un volumen igual al de partida.

4.7.5. Amplificación del ADN proveniente del ChIP

La amplificación se llevó a cabo por PCR. Se amplificaron 2 μl del ADN proveniente del ChIP en una mezcla conteniendo buffer de reacción (1X); MgCl_2 (2 mM); primers específicos (0,5 μM); dNTPs (0,5 mM); DMSO (5 %); Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen) (0,05 U/ μl) y H_2O hasta completar un volumen final de 50 μl . La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el programa de amplificación que se detalla a continuación: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 minutos; 35 ciclos de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 segundos, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 segundos y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 segundos; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto y finalmente $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los primers utilizados amplifican un fragmento (-241 a +98) de la zona del promotor de la FQ de 339pb (Taketani *et al.*, 1999). Los primers se indican a continuación:

Secuencia (5' - 3')

Nombre	Primer Forward	Primer Reverse
FQ	TTTCGACCAGGTTGGCAGAA	AAGCATTTCCGGGACGGC

4.8. Real Time

4.8.1. Extracción de ARN

Se extrajo el ARN total de hígado de ratón con el reactivo TRI REAGENTS - MCR - Molecular Research Center Inc. según las recomendaciones del fabricante.

La concentración total y pureza del ARN se determinaron mediante análisis espectrofotométrico a 260 y 280 nm.

4.8.2. Obtención del ADNc: Transcripción reversa o retrotranscripción (RT)

Se tomó un volumen de la solución de ARN equivalente a 1 µg y se desnaturalizó 5 minutos a 65 °C. Posteriormente se colocó en hielo.

Para la retrotranscripción se empleó una mezcla conteniendo: buffer de reacción (1X); DTT (10 mM); OligodT (0,025 µg/µl); dNTPs (0,05 mM); enzima M-MLV transcriptasa reversa de Invitrogen (10 U/µl) y H₂O hasta completar un volumen final de reacción de 20µl. Se incubó 1 hora a 37 °C.

4.8.3. PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)

El ADNc se amplificó por qPCR en la siguiente mezcla: SYBR® Select - Master Mix - Applied Biosystems - Life Technologies (1X); primers (0,2 mM); 2 µl de ADNc y H₂O hasta completar un volumen final de 20 µl. El ADNc del TfR1 se utilizó sin diluir mientras que para la β-actina se empleó una dilución 1:10. Las secuencias de los primers específicos para cada uno de los genes analizados se muestran a continuación (Dupic *et al.*, 2002):

Secuencia (5' - 3')

Nombre	Primer Forward	Primer Reverse	Fragmento pb
TfR1	TCATGAGGGAAATCAATGATCGTA	GCCCCAGAAGATATGTCCGAA	100
β-actina	GACGGCCAAGTCATCACTATTG	CCACAGGATTCCATACCCAAGA	90

Para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se utilizó un instrumento Step One™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) con el siguiente programa: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Cada reacción de qPCR se realizó por duplicado y cada experimento se repitió al menos tres veces.

Los resultados se normalizaron con el gen de referencia (β -actina) y fueron analizados con el programa Step One™ Software Versión 2.3 (Applied Biosystems).

La fluorescencia debida a la unión del SYBR® a las dobles cadenas de ADN se midió en la etapa de annealing/extensión a 60 °C.

Para confirmar la existencia de un sólo producto de PCR y la ausencia de dímeros de primers se llevó a cabo al final de cada reacción de PCR el análisis de la curva de Melting.

Cada muestra se realizó por triplicado, y se utilizaron como blanco los reactivos de la qPCR junto con los primers sin la adición de la muestra.

Las veces de cambio en la expresión del gen se calcularon utilizando los valores de ciclo umbral (Ct). Se definió Ct como el número de ciclos al que la fluorescencia cruza un umbral fijo de referencia por encima de la línea base. Cuanto mayor es la concentración inicial del ADNc diana, más temprano se observa un aumento significativo de la fluorescencia.

4.9. Bibliografía

- ✓ Birnboim H. & Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7(6)**: 1513-1523.
- ✓ Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- ✓ Chomczynsky P. & Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Annal. Biochem.* **162**: 156-159.
- ✓ Dupic F., Fruchon S., Bensaid M., Loreal O., Brissot P. *et al.* (2002) Duodenal mRNA expression of iron related genes in response to iron loading and iron deficiency in four strains of mice. *Gut.* **51(5)**: 648-653.
- ✓ Taketani S., Mohri T., Hioki K., Tokunaga R. & Kohno H. (1999) Structure and transcriptional regulation of the mouse ferrochelatase gene. *Gene.* **227(2)**: 117-124.

Capítulo 5

TÉCNICAS DE HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

5.1. Estudios histológicos

Después del sacrificio de los animales, los hígados y los páncreas fueron removidos, fijados inmediatamente en formol 10 % (v/v) y procesados para su inclusión en parafina. Los estudios histológicos se realizaron sobre cortes seriados de los órganos. Se hicieron cortes sucesivos de 5 μm de espesor, el primero se coloreó con la técnica de hematoxilina-eosina; los restantes cortes, en blanco, se utilizaron para técnicas de inmunohistoquímica para determinar insulina y/o glucagon. Estos ensayos se realizaron como parte de una colaboración con el Dr. Roberto P. Meiss, Jefe de la División Patología Experimental de la Academia Nacional de Medicina.

RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN

Capítulo 1

EXPRESIÓN DEL ALA-S1 EN UN MODELO MURINO DE DIABETES *MELLITUS* TIPO 1

1.1. Modelo de diabetes *mellitus* tipo 1

En estudios realizados en roedores y embriones de pollo se ha demostrado que la glucosa inhibe o previene la inducción mediada por drogas de la enzima ALA-S1 hepática. Además, la administración de grandes cantidades de glucosa provoca una disminución en la excreción de precursores del hemo y una mejoría clínica en pacientes con PAI (Thunell *et al.*, 2000, 2007). Estas observaciones conducen a plantear la existencia de una relación entre el metabolismo de los hidratos de carbono y el metabolismo del hemo llamado “efecto glucosa” (Handschin *et al.*, 2005). Nuestro objetivo es estudiar a nivel molecular este efecto y para ello se ha elegido un modelo animal de diabetes *mellitus* tipo 1 inducida por STZ (Rerup, 1970). Este modelo presenta concentraciones altas de glucosa que pueden ser reguladas por la administración de distintas drogas, niveles disminuidos de insulina, resistencia periférica a esta hormona y alteraciones en la transducción de señales dependientes de ella (Folli *et al.*, 1993).

1.2. Niveles de glucosa e insulina en los ratones tratados con STZ

Para llevar a cabo el modelo de diabetes *mellitus* tipo 1, se utilizaron ratones machos de la cepa *CF1* los cuales fueron tratados con una única dosis de SZT (170 m/kg *i.p.*).

La diabetes se confirmó a los 16 días de iniciada la intoxicación y los animales con niveles de glucosa en sangre mayores a 300 mg/dl fueron sacrificados a los 16, 20, 24, 32, 36 y 42 días post administración de la droga.

A los diferentes tiempos ensayados se determinaron en los animales controles y tratados el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre y orina (Tabla 1).

A los 32 días de iniciado el tratamiento el valor medio de la glucemia en los animales controles fue de 165 mg/dl y en el grupo STZ los niveles de glucosa se encontraron significativamente aumentados, aproximadamente un 400 % (valor medio 700 mg/dl) en comparación con el grupo control. Los ratones controles no eliminaron glucosa en orina, mientras que la glucosuria de los animales diabéticos alcanzó un valor de 800 mg/ml (Tabla 1).

Grupo	Peso (g)	Glucemia (mg/dl)	Glucosuria (mg/ml)
C	34±3,1	165±36	-
STZ 16	18±5,3 ^a	500±60 ^a	500 ^a
STZ 24	23±4,2 ^a	680±145 ^a	700 ^a
STZ 32	22±5,1 ^a	717±45 ^a	800 ^a

Tabla 1 Peso corporal, niveles de glucosa en sangre y orina a diferentes tiempos En los animales tratados con STZ se determinaron el peso corporal, la glucemia y la glucosuria a los 16, 24 y 32 días de administrado el STZ. Los datos son expresados como valor medio ± SEM (n≥3). ^aP <0,001 respecto al control.

Generalmente, la instauración de la diabetes en roedores está acompañada de una disminución en el peso corporal (Makino *et al.*, 1980). Por tal motivo, se controló este parámetro como un reflejo de su estado físico. Como se observa en la Tabla 1, a los 32 días de tratamiento, el peso en los animales diabéticos disminuyó un 35 % en comparación con los controles. Estos datos concuerdan con lo observado en ratas diabetizadas con STZ que presentan un metabolismo predominantemente catabólico donde la pérdida de peso, debida a un aumento en la degradación de las proteínas musculares, puede corregirse por la administración de insulina (Clark *et al.*, 1985).

Estas observaciones también están de acuerdo con las características bioquímicas presentes en la diabetes tipo 1 en diferentes modelos experimentales, como son la hiperglucemia y la glucosuria (Makino *et al.*, 1980).

La diabetes tipo 1 se caracteriza principalmente por presentar niveles disminuidos de insulina en sangre (Wei, 2007). Por ello, con el fin de validar el modelo murino de diabetes tipo 1 se determinó por RIA la concentración de insulina en el suero de los animales tratados con STZ y controles (Fig. 1).

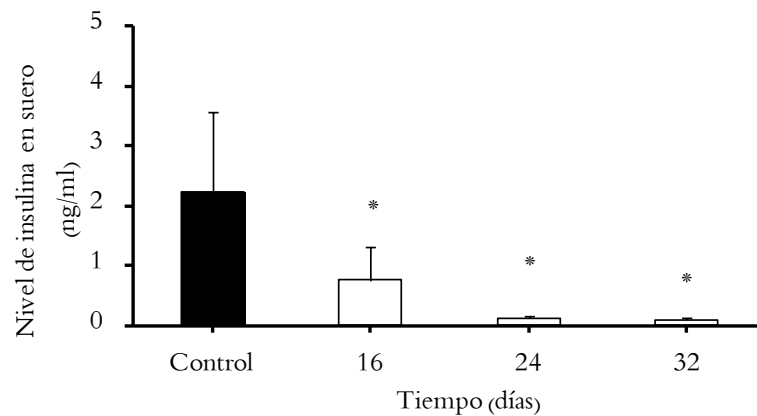


Figura 1 Valores de insulina en suero de ratones diabéticos en función del tiempo Determinación por RIA de los niveles de insulina séricos en función del tiempo en los animales controles y los tratados con STZ. Los datos son expresados como valor medio \pm SEM ($n \geq 3$). * $p < 0,05$ respecto al control.

A las 2 semanas de iniciado el tratamiento con STZ los niveles de insulina en el suero disminuyeron un 70 % y continuaron decreciendo hasta el día 32, alcanzando valores cercanos a cero (valor medio 0,4 ng/ml). El valor medio de insulina en los animales controles fue de 2,7 ng/ml. De acuerdo con estos resultados el STZ fue un agente diabético efectivo en la cepa de ratones *CF1*.

1.3. Estudios histológicos del páncreas

En roedores, la distribución de las diferentes poblaciones celulares en los islotes pancreáticos es distinta de la observada en humanos. Las células α y δ se encuentran en la periferia de los islotes mientras que las células β productoras de insulina se encuentran en el centro (Cubillos *et al.*, 2008) (Fig. 2).

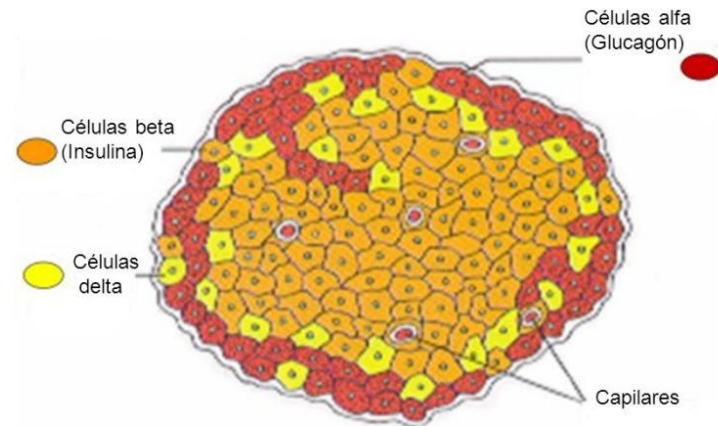


Figura 2 Islote pancreático o de Langerhans

Con el fin de verificar si la caída en los niveles de insulina sérica observada en los ratones *CFI* debida a la administración de STZ se correlaciona histológicamente con la destrucción de las células β , se realizaron tinciones con eosina-hematoxilina e inmunohistoquímica para insulina y glucagón en cortes del páncreas de los animales tratados con este diabetógeno (Fig. 3).

En el páncreas de los ratones controles se encontraron preservados los acinos y los islotes (Fig. 3a). La inmunotinción para insulina fue positiva intensa en el 80 % de las células β (Fig. 3b) y para glucagón en el 20 % de las células α (Fig. 3c).

En los cortes de páncreas de los animales diabéticos, se observó una disminución en el tamaño de los islotes a los 24 días de haber sido inyectados con STZ. También se comprobó la presencia de células basófilas de tamaño mediano con núcleos pequeños (Fig. 3d). En menos del 50 % de las células β la inmunotinción para insulina fue positiva moderada (Fig. 3e) mientras que para glucagón fue positiva intensa en más del 50 % de las células α apareciendo un aumento relativo de ellas debido a una disminución en las β (Fig. 3f).

En el páncreas del grupo STZ, a los 32 días se observaron, islotes alterados en formas y tamaños (flecha). Los acinos (círculo) peri-insulares presentaron alteraciones histológicas nucleares y citoplasmáticas (Fig. 3g). La inmunotinción para insulina fue positiva intensa en el 30 % de las células β (Fig. 3h) y para

glucagon fue positiva en más del 50 % de las células α , observándose un aumento relativo de éstas debido a una disminución de las β (Fig. 3i).

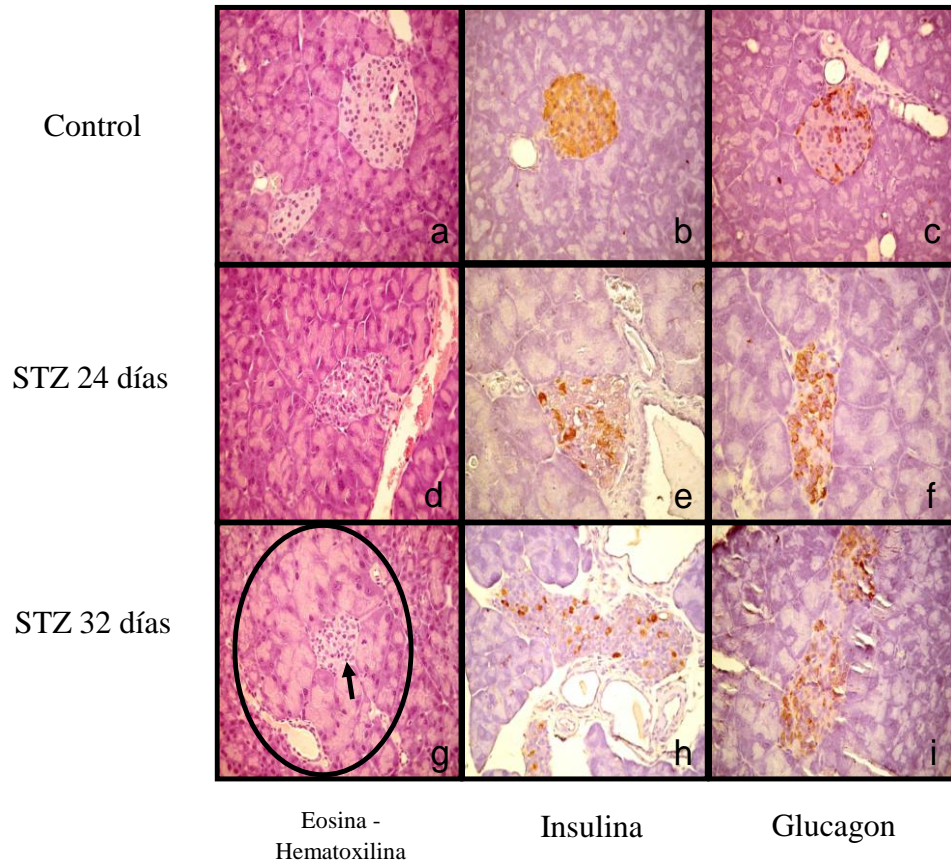


Figura 3 Cortes del páncreas a distintos tiempos Cortes del páncreas de los animales controles y diabéticos a los 24 y 32 días de iniciado el tratamiento. (a, d, g) tinción eosina-hematoxilina (b, e, h) inmunohistoquímica para insulina (c, f, i) inmunohistoquímica para glucagon.

De acuerdo con las observaciones histológicas, la STZ produjo un daño en los islotes pancreáticos que llevó a una caída en los niveles de insulina y a cambios en el entorno celular, apoyando la hipótesis de que los islotes desempeñan un papel clave en la regulación de la estructura y la función del páncreas exocrino. En animales experimentales la destrucción de los islotes inducida por STZ provocó no sólo una atrofia anatómica del órgano, sino también una reducción funcional en la porción exocrina del páncreas. Esta insuficiencia exocrina también se aprecia clínicamente en pacientes diabéticos insulino-dependientes. Estas modificaciones histológicas encontradas en los ratones STZ concuerdan con las alteraciones pancreáticas

presentes en cuadros no experimentales de diabetes *mellitus* tipo 1, donde la reducción del número y tamaño de los islotes constituye el hallazgo más frecuente. Estas observaciones implican la existencia de algún tipo de relación funcional entre los islotes y las células acinares (Barreto *et al.*, 2010). Por otra parte, Unger & Grundy (1985) demostraron que en cuadros de diabetes no controlados la hiperglucemia crónica origina depleción de las células β .

1.4. Niveles de expresión del ARNm del ALA-S1 hepática en los ratones diabéticos

En roedores y en embriones de pollo la glucosa inhibe o impide la inducción mediada por droga del ALA-S1 hepática (Giger & Meyer, 1981; Doss *et al.*, 1985). Sin embargo, esta respuesta no se encuentra *in vitro*, debido a que la glucosa ejerce su efecto sobre los hepatocitos, modulando la relación plasmática entre la insulina y el glucagon y por consiguiente los niveles de AMPc hepáticos (Giger & Meyer, 1981; Giono *et al.*, 2001). Se ha observado que la exposición de cultivos de hepatocitos a diversas hormonas, particularmente insulina y glucagon, influye en la inducción de la actividad del ALA-S1 y la acumulación de porfirinas (Giger & Meyer, 1981). Estos datos sugieren que el “efecto glucosa” sobre la síntesis de hemo puede estar mediado por hormonas.

Considerando que la insulina y la glucosa están implicadas en la regulación del ALA-S1 como lo demuestran estudios realizados *in vivo* e *in vitro* (Scassa *et al.*, 2001, 2004) se evaluó la expresión del ARNm del ALA-S1 hepática en función del tiempo en los ratones tratados con STZ (Fig. 4).

A los 24 días de haber sido inyectados con el agente diabetizante, la expresión del ARNm del ALA-S1 fue ligeramente mayor en el grupo STZ que en el grupo control alcanzando un incremento del 100 % a los 32 días. Este aumento continuó hasta el día 42 (Fig. 4). Por lo tanto el estado diabético altera la expresión del ARNm del ALA-S1 a partir de los 24 días de tratamiento sugiriendo que la insulina participaría en la regulación de esta enzima ya que el aumento en el ARNm coincide con la caída en el nivel de esta hormona.

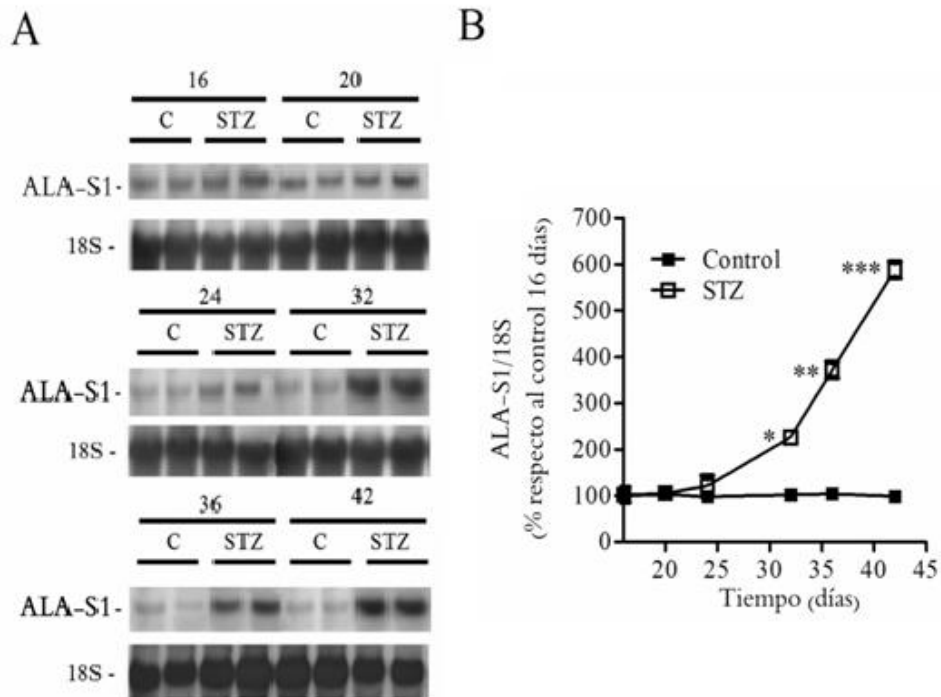


Figura 4 Niveles de expresión del ARNm del ALA-S1 en el hígado de los animales diabéticos en función del tiempo (A) Análisis por Northern blot. Comenzando el día 16 luego de la inyección *i.p.* de STZ, las muestras de ARNm de hígado fueron tomadas a diferentes tiempos (16, 20, 24, 32, 36, 42 días) y los niveles del ARNm del ALA-S1 fueron analizados por Northern blot **(B)** Los datos son expresados como porcentaje de los valores de los animales controles al día 16. Los datos son expresados como valor medio \pm SEM ($n \geq 3$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto al grupo control.

Con el fin de determinar si el incremento observado en el ARNm del ALA-S1 se debió a una mayor transcripción o a cambios en su estabilidad se estudió la vida media del mismo en el hígado de los animales controles y diabéticos (Fig. 5).

Entre los ratones diabéticos y los controles no se encontraron cambios en la vida media del ARNm del ALA-S1 (Fig. 5). En ambos grupos ésta fue aproximadamente de 25 minutos concordando con lo informado en la literatura (Yamamoto *et al.* 1988). Estos resultados demuestran que el aumento observado en los niveles del ALA-S1 en los animales diabéticos es debido a una mayor transcripción del ARNm y no a cambios en su tasa de degradación.

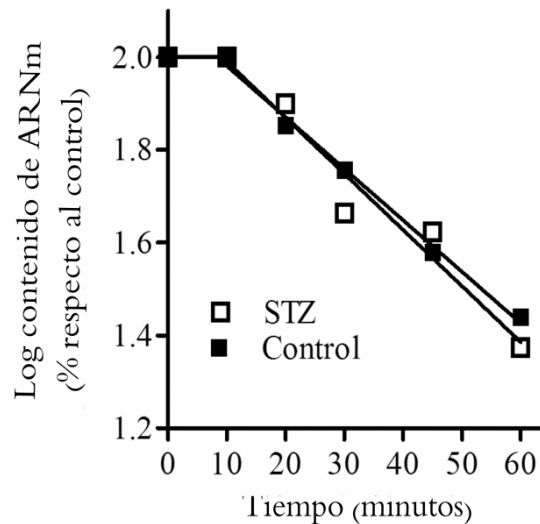


Figura 5 Estabilidad del ARNm del ALA-S1 hepática Determinación de la estabilidad del ARNm del ALA-S1 en los animales controles y diabéticos, 32 días posteriores a la inyección *i.p.* de STZ. Los animales control y STZ fueron tratados con actinomicina D *i.p.* (2,5 µg/g) y fueron sacrificados a los tiempos indicados.

1.5. Niveles de expresión de proteína del ALA-S1 hepática en los ratones diabéticos

Con el fin de determinar si el aumento observado en el ARNm del ALA-S1 en los animales diabéticos fue acompañado por un aumento en los niveles de proteína se realizaron estudios de inmunoblot en función del tiempo (Fig. 6).

A los 24 días de haber sido inyectados con el agente diabetizante, los niveles de proteína del ALA-S1 fueron mayores en el grupo STZ (200 %) que en el grupo control alcanzando un incremento del 370 % a los 32 días de tratamiento (Fig. 6).

Los resultados demuestran que los niveles de proteína del ALA-S1 aumentan significativamente en función del tiempo siguiendo el mismo comportamiento que el ARNm.

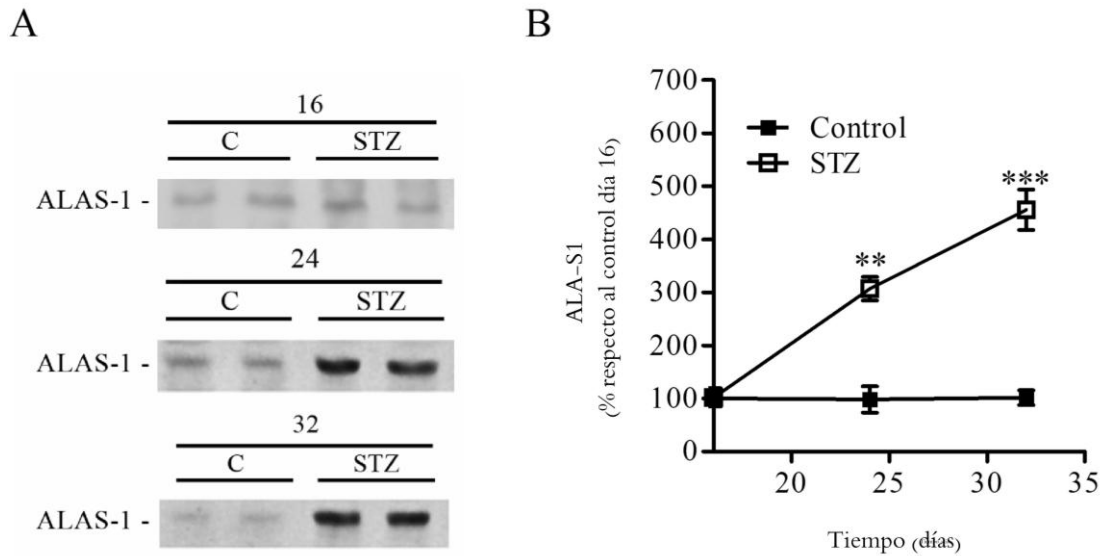


Figura 6 Niveles de proteína del ALA-S1 en el hígado de los animales diabéticos y controles en función del tiempo (A) Análisis por Western blot. Los niveles de la proteína del ALA-S1 hepática fueron determinados a los 16, 24 y 32 días posteriores al tratamiento con STZ. Gel 7,5 %; 60 μ g de proteína por calle **(B)** Análisis densitométrico. Los datos son expresados como el valor medio \pm SEM ($n \geq 3$). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto al control.

1.6. Determinación de precursores del hemo en el modelo de diabetes tipo 1

La clínica de los ataques de PAI refleja neuropatías del sistema nervioso central, periférico y autónomo que están asociadas con un incremento en la actividad del ALA-S1 hepática. Esta inducción, junto con un bloqueo enzimático parcial en la síntesis de hemo, llevan a una acumulación de los precursores ALA y PBG (Herrick & McColl, 2005; Kauppinen, 2005).

Con el propósito de determinar si los cambios observados en los niveles de expresión del ALA-S1 en el modelo de diabetes se reflejaron en cambios en los niveles de precursores del hemo, se determinaron las concentraciones urinarias de ALA y PBG en los animales controles y los diabetizados con STZ a lo largo del tiempo de ensayo (Fig. 7).

Las determinaciones bioquímicas demostraron que los precursores ALA y PBG se encontraron aumentados inmediatamente de establecida la diabetes. El ALA alcanzó un valor de 10 mg/24 hs (control 2,18 mg/24 hs) y el PBG un valor de 6 mg/24 hs (control: 1,56 mg/24 hs) a los 32 días posteriores al tratamiento con STZ (Fig. 7).

El incremento en los niveles de ARNm y proteína del ALA-S1 en los animales diabéticos se tradujeron en una mayor actividad de la enzima que se reflejó en el aumento observado en la concentración urinaria de ALA. Además, el aumento de ALA, podría deberse a una inhibición en la actividad del ALA-D (resultado no mostrado). Estos resultados, están en concordancia con lo observado en un modelo murino de diabetes donde los altos niveles de glucosa producidos por la administración de STZ llevaron a una inhibición tanto de la actividad del ALA-D (Polo *et al.*, 1995) como de la PBGD (Caballero *et al.*, 2000) hepáticas.

La instauración de la diabetes tuvo un efecto significativo sobre los marcadores bioquímicos de una PAI como son el contenido urinario de ALA y PBG. Estos resultados confirman los descriptos por otros autores que demuestran que existe una relación entre la biosíntesis de hemo y el metabolismo de los carbohidratos.

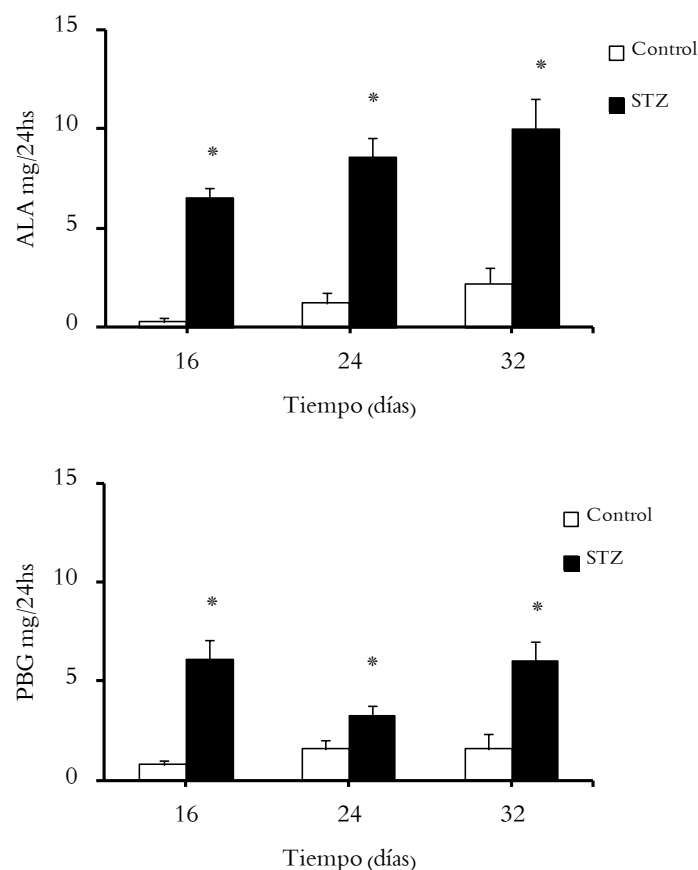


Figura 7 Concentración urinaria de ALA y PBG en función del tiempo Determinación de la concentración urinaria de ALA y PBG en los animales controles y diabéticos a los 16, 24 y 32 días de iniciado el tratamiento. Los datos son expresados como valor medio \pm SEM ($n \geq 3$). * $p < 0,05$

1.7. Niveles de AMPc en el hígado de los animales diabéticos

Debido a que el AMPc participa en la regulación del ALA-S1 a través de la vía PKA (Giono *et al.*, 2001; Scassa *et al.*, 2004) y que en los animales diabéticos el glucagon, hormona responsable de la activación de la misma, se encuentra aumentada (Authier & Desbuquois, 2008) se decidió determinar si el incremento en el tiempo observado en el ARNm del ALA-S1 en los animales diabéticos es debido a cambios en los niveles de AMPc. Con este fin se cuantificaron los niveles de este nucleótido en el hígado de los animales inyectados con STZ y controles a diferentes tiempos (Fig. 8).

En los animales diabéticos a partir de los 16 días de iniciado el tratamiento con STZ se observó un aumento del 86 % en los niveles de AMPc. Este incremento se mantuvo hasta el día 24, regresando a valores normales el día 32 (61 picomol/gr tejido) (Fig. 8).

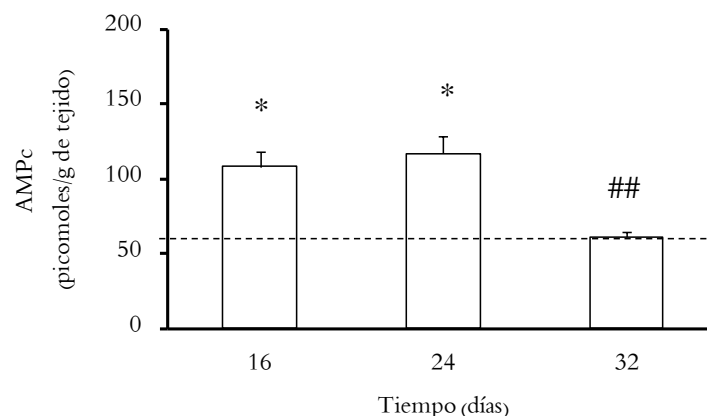


Figura 8 Concentración de AMPc en función del tiempo Determinación de la concentración de AMPc en los animales diabéticos y controles (----) a los 16, 24 y 32 días de iniciado el tratamiento. Los datos son expresado como el valor promedio \pm SEM ($n \geq 3$). * $p < 0,05$ respecto al control, ## $p < 0,01$ respecto al tratamiento con STZ.

Se ha demostrado que la concentración de los receptores de glucagon está directamente relacionada con los niveles y el tiempo de exposición a la hormona y que la reducción dependiente de glucagon en el número de sus receptores correlaciona con la caída en la producción de AMPc estimulada por la misma (Santos

& Blazquez, 1982). Estos resultados sugieren que en este modelo inducido por STZ la caída de AMPc al día 32 de iniciada la diabetes podría deberse a una desensibilización homóloga y/o heteróloga volviendo al hígado insensible al estímulo hormonal.

En las primeras semanas de diabetización el aumento en la concentración de AMPc encontrada en los ratones STZ correlaciona con los niveles aumentados del ARNm del ALA-S1. Sin embargo la caída en la concentración de AMPc el día 32 de tratamiento indica que este nucleótido no estaría participando en la inducción del ALA-S1 a ese tiempo.

1.8. Bibliografía

- ✓ Authier F. & Desbuquois B. (2008) Glucagon receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **65(12)**: 1880-1899.
- ✓ Barreto S., Carati C., Toouli J. & Saccone G. (2010) The islet-acinar axis of the pancreas: more than just insulin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **299(1)**: G10-G22.
- ✓ Caballero F., Gerez E., Batlle A. & Vazquez E. (2000) Preventive aspirin treatment of streptozotocin induced diabetes: blockage of oxidative status and reversion of heme enzymes inhibition. *Chem. Biol. Interact.* **126(3)**: 215-225.
- ✓ Clark A., Fagan J. & Mitch W. (1985) Selectivity of the insulin-like actions of vanadate on glucose and protein metabolism in skeletal muscle. *Biochem. J.* **232**: 273-276.
- ✓ Cubillos V., López C. & Alberdi A. (2008). Histopathologic and immunohistochemical study of pancreas in alloxan-induced diabetic dogs *Arch. Med. Vet.* **40(2)**: 169-177.
- ✓ Doss M., Sixel-Dietrich F. & Verspohl F. (1985) "Glucose effect" and rate limiting function of uroporphyrinogen synthase on porphyrin metabolism in hepatocyte culture: relationship with human acute hepatic porphyrias. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **23**: 505-513.
- ✓ Folli F., Saad M., Backer J. & Kahn C. (1993) Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **92**: 1787-1794.
- ✓ Giger U. & Meyer U. (1981) Induction of delta-aminolevulinate synthase and cytochrome P-450 hemoproteins in hepatocyte culture. Effect of glucose and hormones. *J. Biol. Chem.* **256**: 11182-11190.
- ✓ Giono L., Varone C. & Cánepa E. (2001) 5-Aminolaevulinate synthase gene promoter contains two cAMP-response elements (CRE)-like sites that confer

positive and negative responsiveness to CRE-binding protein (CREB). *Biochem. J.* **353**: 307-316.

- ✓ Handschin C., Lin J., Rhee J., Peyer A. & Chin S. (2005) Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha. *Cell.* **122(4)**: 505-515.
- ✓ Herrick A. & McColl K. (2005) Acute intermittent porphyria. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **19(2)**: 235-249.
- ✓ Kauppinen R. (2005) Porphyrias. *Lancet* **365(9455)**: 241-252.
- ✓ Makino S., Kunimoto K., Muraoka Y., Mizushima Y., Katagiri K. *et al.* (1980) Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu.* **29(1)**: 1-13.
- ✓ Polo C., Vázquez E., Gerez E., Caballero F. & Batlle A. (1995) STZ-induced diabetes in mice and heme pathway enzymes. Effect of allylisopropylacetamide and alpha-tocopherol. *Chem. Biol. Interact.* **95(3)**: 327-334.
- ✓ Rerup C. (1970) Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.* **22**: 485-518.
- ✓ Santos A. & Blazquez E. (1982) Direct evidence of a glucagon-dependent regulation of the concentration of glucagon receptors in the liver. *Eur. J. Biochem.* **121(3)**: 671-677.
- ✓ Scassa M., Guberman A., Varone C. & Cánepa E. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for the regulation of 5-aminolevulinate synthase gene expression by insulin. *Exp. Cell. Res.* **271(2)**: 201-213.
- ✓ Scassa M., Guberman A., Ceruti J. & Cánepa E. (2004) Hepatic nuclear factor 3 and nuclear factor 1 regulate 5-aminolevulinate synthase gene expression and are involved in insulin repression. *J. Biol. Chem.* **279(27)**: 28082-28092.

- ✓ Thunell S., Harper P., Brock A. & Petersen N. (2000) Diagnosis and monitoring in the acute porphyrias. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **60(7)**: 541-559.
- ✓ Thunell S., Pomp E. & Brun A. (2007) Guide to drug porphyrogenicity prediction and drug prescription in the acute porphyrias. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **64**: 668-679.
- ✓ Unger R. & Grundy S. (1985) Hyperglycaemia as an inducer as well as consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetologia* **28**: 119-121.
- ✓ Wei D., Li M. & Ding W. (2007) Effect of vanadate on gene expression of the insulin signaling pathway in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biol. Inorg. Chem.* **12(8)**: 1265-1273.
- ✓ Yamamoto M., Kure S., Engel J. & Hiraga, K. (1988) Structure, turnover, and haem-mediated suppression of the level of ARNm encoding rat liver delta aminolevulinate synthase. *J. Biol. Chem.* **263**: 15973-15979.

Capítulo 2

EFFECTO DE LA INSULINA Y EL VANADATO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ALA-S1

en un modelo murino de diabetes *mellitus* tipo 1

Los compuestos de vanadio ejercen en el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo efectos similares a la insulina, importantes para la función y desarrollo normal de las células. Como fue descrito en el Capítulo 1 de resultados, existe una relación entre la expresión del ALA-S1 y la insulina. Se ha sugerido que las sales de vanadio al ser inhibidores de fosfatasas de tirosina activan la vía de señalización de esta hormona (Srivastava & Mehdi, 2005). Teniendo en cuenta estas observaciones, se estudiará el efecto del vanadato sobre la regulación del ALA-S1 con el fin de evaluar su potencial como agente terapéutico para el tratamiento de los ataques de PAI.

2.1. Niveles de glucosa e insulina en los ratones diabéticos tratados con insulina o vanadato

Entre los efectos *in vivo* de los compuestos de vanadio, el descubrimiento que atrajo la atención de los diabetólogos y endocrinólogos, fue el de Heyliger *et al.* (1985) que demostró en un modelo animal de diabetes *mellitus* que el ortovanadato de sodio normalizaba la hiperglucemia. Estos hallazgos fueron confirmados por varios grupos en modelos animales de diabetes *mellitus* tipo 1 y 2, así como en humanos. En la mayoría de estos estudios se emplearon sales inorgánicas de vanadio como el metavanadato de sodio (NaMV; NaVO₃) (Srivastava & Mehdi, 2005).

En general se observó que independientemente de la sal de vanadio empleada, la disminución en los niveles de glucosa plasmática, glucosuria, volumen urinario y la mejora en la tolerancia a la glucosa oral fueron similares (Srivastava & Mehdi, 2005).

Con el fin de estudiar en el modelo de diabetes tipo 1 inducida por STZ la eficacia del vanadato como agente insulino-mimético, los ratones diabéticos recibieron este compuesto en el agua de bebida durante 16 días consecutivos posteriores a la instauración de la diabetes. Durante el mismo período de tiempo otro grupo de animales diabéticos recibió insulina. Al día 32 de administrada la STZ, se determinó en los distintos grupos el efecto de los diferentes tratamientos cuantificando el peso corporal, la glucemia, la glucosuria y los niveles de insulina séricos (Tabla 1).

Como un indicador del estado físico de los animales se evaluó el peso corporal. En los ratones diabéticos se encontró una pérdida de peso ($23\pm 4,2$ g) en comparación con los controles ($34\pm 3,1$ g). El tratamiento con insulina provocó un aumento significativo del mismo ($31\pm 5,1$ g), mientras que el vanadato no tuvo efecto sobre este parámetro ($20\pm 3,7$ g) (Tabla 1). Estas observaciones están de acuerdo con informes previos que demuestran que la caída de peso en las ratas tratadas con STZ puede corregirse completamente por la administración de insulina pero no por la terapia con vanadio (Meyerovitch *et al.*, 1987).

Grupo	N	Peso (g)	Glucemia (mg/dl)	Glucosuria (mg/ml)	Insulina en suero (ng/ml)
C	12	$34\pm 3,1$	165 ± 36	-	$2,7\pm 1$
STZ	18	$23\pm 4,2^a$	717 ± 145^a	800^a	$0,4\pm 0,2^c$
STZ + I	9	$31\pm 5,1^b$	117 ± 45^b	-	$7,7\pm 1^{a,b}$
STZ + V	10	$20\pm 3,7^a$	$392\pm 100^{a,b}$	-	$3,8\pm 2,1^b$

Tabla 1 Efecto de la insulina y el vanadato sobre la glucemia, glucosuria, peso corporal y niveles de insulina en los ratones STZ A los 32 días de administrada la STZ se evaluó el peso corporal, los niveles de glucosa e insulina en sangre y la glucosuria en orina en los diferentes grupos. Los valores tabulados para cada grupo son la media \pm SD. Diferencia significativa con respecto al control ^a P <0,001; ^c P <0,01. Diferencia significativa con respecto a STZ ^b P <0,001.

El valor medio de la glucemia en los ratones diabéticos aumentó significativamente (300 %) en comparación con los controles (165 mg/dl). Se observó una reducción considerable de los niveles de glucosa cuando los ratones diabéticos fueron tratados con insulina o vanadato durante 16 días aunque sólo la insulina restauró la glucemia a valores normales. Ambos tratamientos revirtieron completamente la glucosuria (Tabla 1).

Cuando se cuantificaron los niveles de insulina se observó que el tratamiento con STZ produjo una caída significativa del 85 % (valor medio 0,4 ng/ml) en el nivel de la hormona en comparación con los controles (2,7 ng/ml). El tratamiento de los ratones STZ con vanadato provocó un aumento en la concentración sérica de insulina de un 40 % (3,8 ng/ml) mientras que en los animales que recibieron insulina se observó un aumento del 185 % (7,7 ng/ml) (Tabla 1). El incremento en los niveles séricos de insulina provocado por el vanadato está de acuerdo con estudios que demostraron que el tratamiento con vanadio eleva la reserva de insulina pancreática aumentando el número de gránulos inmaduros en las células β , favoreciendo un buen desarrollo del retículo endoplasmático rugoso y mejorando la función secretora de las células β . En relación con estas observaciones, se ha propuesto que el vanadato evita la destrucción completa de las células β dañadas, preserva la porción que sobrevivió a la toxicidad de la STZ favoreciendo una hiperfunción de las mismas, previene la instalación de células T en los islotes y permite la regeneración de células β a partir de precursores presentes en la porción endócrina o exocrina del páncreas. El grado de protección del vanadio depende del número relativo de células β que sobrevivieron a la destrucción por STZ (Ahmadi *et al.*, 2010).

De acuerdo con los parámetros evaluados, en este modelo de diabetes tipo 1 el vanadato fue efectivo como agente insulino-mimético.

2.2. Efecto de la insulina y el vanadato sobre el ARNm y la proteína del ALA-S1 en los animales diabéticos

Dado que estudios previos demostraron que en hepatocitos primarios de ratón y en hepatocitos de ratón transformados SV40 la insulina reprime la expresión del ALA-S1 inhibiendo su transcripción (Scassa *et al.*, 2004; Handschin *et al.*, 2005) y que el vanadio y los compuestos de vanadio son agentes insulino-miméticos se

estudió el efecto de este compuesto y el de la insulina sobre la expresión del ALA-S1 hepática en los animales tratados con STZ.

En los animales diabéticos a los 32 días de administrada la STZ el ARNm y el contenido de ALA-S1 mitocondrial se encontraron aumentados en un 280 y 325 % respectivamente. En los ratones diabéticos tratados con insulina, los niveles del ARNm y de la proteína mitocondrial del ALA-S1 disminuyeron en forma significativa alcanzando valores similares a los del grupo control (Fig. 1 y 2). Sin embargo en el grupo STZ+V, el vanadato, provocó una caída por debajo de los valores controles tanto del ARNm como del contenido de proteína del ALA-S1 hepática (Fig. 1 y 2).

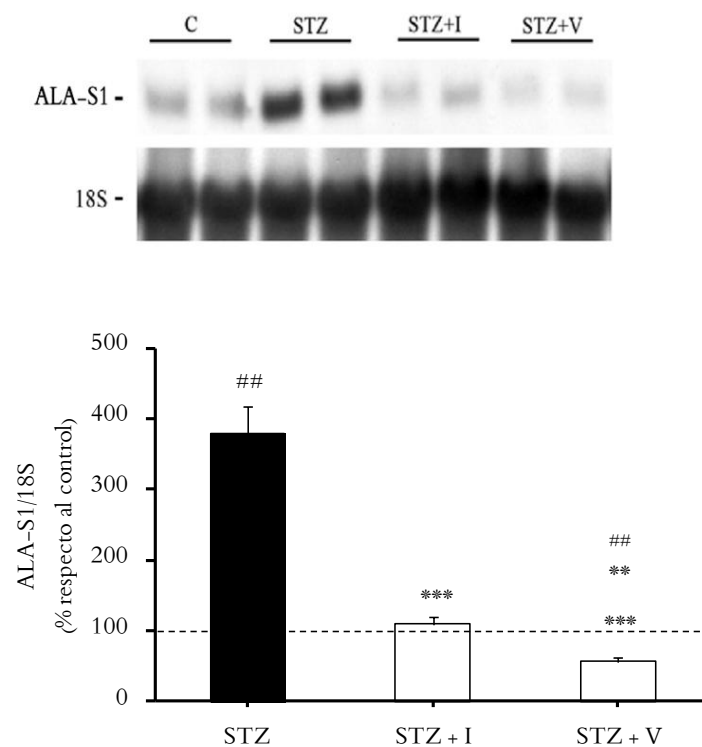


Figura 1 Efecto de la insulina y el vanadato sobre el ARNm del ALA-S1 Los niveles de ARNm del ALA-S1 fueron determinados por análisis de Northern blot y las membranas fueron hibridizadas con una sonda específica para el ARNm del ALA-S1. Como control de carga se utilizó una sonda específica para el ARN 18S. Los datos son expresados como porcentaje de los valores de los animales controles (----) al día 32 obtenidos por el programa Scion Image. Los datos son expresados como valor medio \pm SEM ($n \geq 3$). ## $p < 0,01$ respecto al control, ** $p < 0,01$ respecto a STZ+Insulina y *** $p < 0,001$ respecto al tratamiento con STZ.

Los presentes hallazgos *in vivo* apoyan la existencia de una asociación entre la insulina y la expresión del ALA-S1 hepática. El estado diabético provocó en los animales STZ un aumento en los niveles de expresión del ARNm y de la proteína del ALA-S1 que fueron revertidos por la insulina y el vanadato (Fig. 1 y 2). Este hecho fortalece la hipótesis de que la inducción de esta enzima se debe a una caída en los niveles de insulina y que el vanadato ejerce sobre el ALA-S1 un efecto similar al de la hormona.

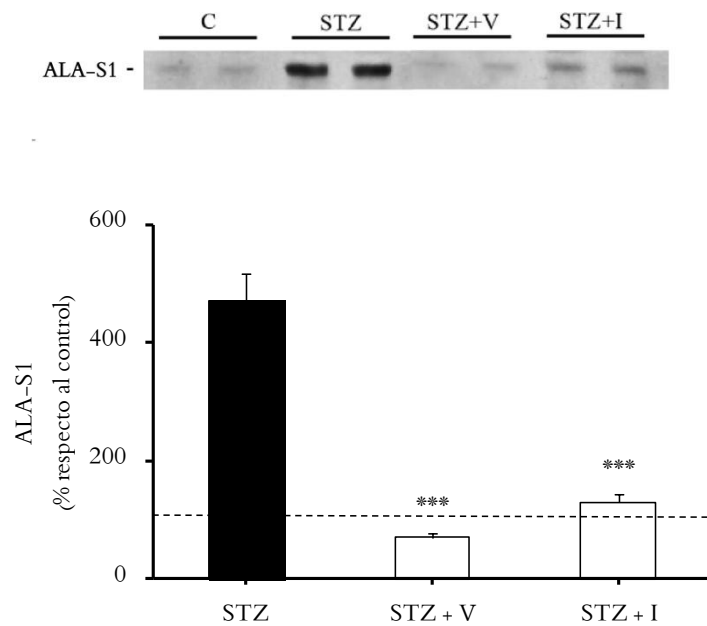


Figura 2 Efecto de la insulina y el vanadato sobre el contenido de proteína del ALA-S1
 Los niveles de proteína del ALA-S1 fueron determinados por Western blot con un anticuerpo policlonal como se describe en Materiales y Métodos. Como control de carga se sembró en todas las calles la misma cantidad de proteína (60 µg; gel 7,5%). Los datos son expresados como porcentaje de los valores de los animales controles (----) al día 32 de administrada la STZ obtenidos por el programa Scion Image. Los datos son expresados como valor medio ± SEM (n≥3). ***p<0,001 respecto al tratamiento con STZ.

Debido a que tanto la insulina como los compuestos de vanadio actúan sobre la vía de señalización PI3K/Akt, se estudiaron algunos intermediarios de esta vía con el fin de investigar el mecanismo de acción del vanadato en la regulación del gen del ALA-S1.

2.3. Efecto de la insulina y el vanadato sobre la fosforilación de IRS1 en los ratones diabéticos

El primer paso en la vía de señalización de la insulina es la fosforilación de IRS1 en Tyrs por el IR activado. La fosforilación de la Tyr 632 es importante para una activación completa dependiente de insulina de la vía PI3K/Akt (Esposito *et al.*, 2001). Estudios precedentes realizados en cultivos celulares indican que la transcripción del ALA-S1 es inhibida por la vía de señalización de la insulina (Scassa *et al.*, 1998; Handschin *et al.*, 2005). Por lo tanto, considerando que la fosforilación de IRS1 es el primer evento desencadenado por la hormona y que ésta interviene en la regulación del ALA-S1, se cuantificaron los niveles de P-IRS1 en los distintos tratamientos con el fin de evaluar su participación en la expresión de la enzima.

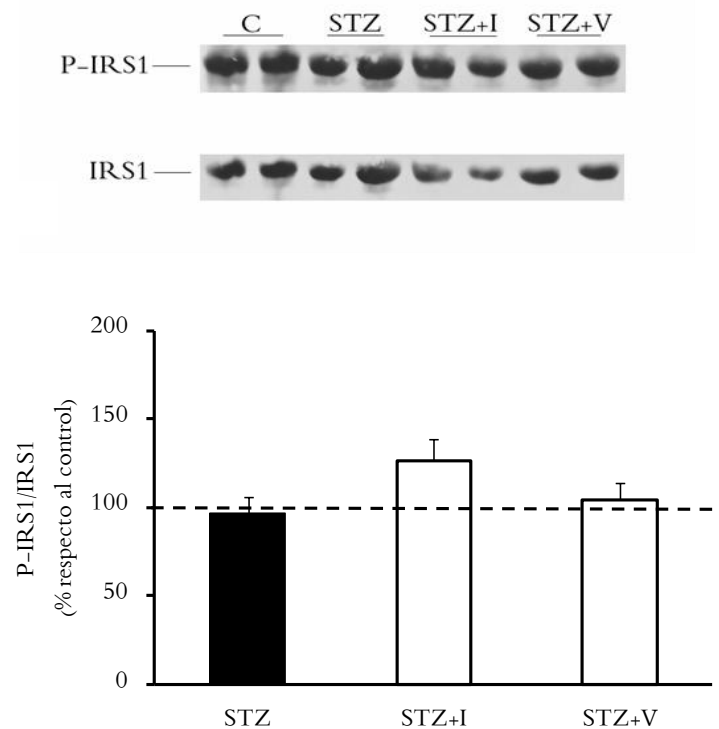


Figura 3 Efecto de la insulina y el vanadato sobre la fosforilación de IRS1 en el hígado de los ratones STZ Análisis por Western blot de los niveles de P-IRS1 (Tyr 632) y de la proteína IRS1. Gel 6 %; 80 μ g de proteína por calle. Los datos son expresados como porcentajes de los valores de los animales control (----) al día 32 de administrada la STZ obtenidos con el programa Scion Image. Los datos son expresados como el valor promedio \pm SEM ($n \geq 3$). * $p < 0,1$ respecto a los controles.

En los ratones diabéticos los niveles de fosforilación de IRS1 no se encontraron modificados cuando se los compara con el grupo control (Fig. 3). Esta fosforilación basal podría deberse a la activación del receptor de insulina por otro ligando como por ejemplo los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1 e IGF-2) (Kido *et al.*, 2001) y/o la fosforilación de IRS1 a través de otro receptor como por ejemplo el de IGF-1 (Fritsche *et al.*, 2008).

En el grupo STZ tratado con insulina se observó una caída significativa en la cantidad de proteína de IRS1 (20 %) sin cambios en los niveles de su fosforilación cuando se los compara con los controles (Fig. 3). Para evaluar la estequiometría aparente de la fosforilación de la Tyr de IRS1, ésta se normalizó con el contenido de su proteína (Inoue *et al.*, 1996). Al ajustarse de esta forma en el grupo STZ+I los niveles de fosforilación dan como resultado un aumento en el estado basal (26 %) en comparación con el grupo control.

Estas observaciones están de acuerdo con estudios realizados en células de hepatoma Fao (Fritsche *et al.*, 2008) y adipocitos 3T3-L1 (Pederson *et al.*, 2001) que demostraron que una estimulación prolongada con insulina, mayor a 24 horas, lleva a una degradación proteosómica de la proteína IRS1 sin modificar los niveles de su ARNm (Boura-Halfon & Zick, 2009).

En los animales diabéticos tratados con vanadato no se observaron cambios en la fosforilación de IRS1 ni en los niveles de su proteína, en comparación con los controles (Fig. 3). Numerosos autores han demostrado (*in vitro* e *in vivo*) que el vanadato aumenta los niveles de fosforilación de IRS1 (Mehdi & Srivastava, 2005; Mehdi *et al.*, 2006), sin embargo cabe destacar que a diferencia de nuestros ensayos, estos estudios han sido realizados en horas o minutos y en algunos, el tratamiento con vanadato fue seguido por la administración de insulina (Mehdi & Srivastava, 2005). Además, ensayos realizados *in vitro* demostraron que el ortovanadato al inhibir la desfosforilación de IRS1 en Tyr inhibe parcialmente su degradación (Pederson *et al.*, 2001).

De acuerdo con los hallazgos experimentales en este modelo murino de diabetes tipo 1, el vanadato y la insulina no estarían ejerciendo su efecto sobre la regulación del gen del ALA-S1 a nivel del sustrato del receptor de insulina IRS1.

2.4. Efecto de la insulina y el vanadato sobre la fosforilación de Akt en los ratones diabéticos

Considerando que Akt puede ser un efector común en las vías de señalización tanto de la insulina como del vanadato se evaluó el efecto de estos compuestos sobre la actividad de la quinasa a través de sus niveles de fosforilación en la Ser473 en los ratones diabetizados con STZ con el fin de determinar su participación en la regulación del ALA-S1 (Fig. 4).

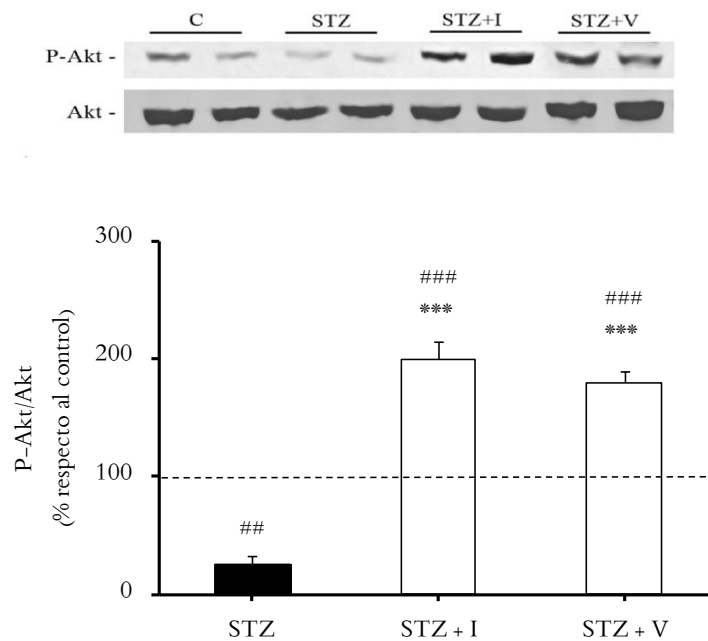


Figura 4 Efecto de la insulina y el vanadato sobre la fosforilación de Akt en el hígado de los ratones STZ Análisis por Western blot de los niveles de P-Akt (Ser473) y de la proteína Akt. Los datos son expresados como porcentajes de los valores de los animales control (----) al día 32 de administrada la STZ obtenidos con el programa Scion Image. Gel 8,5 %; 60 μ g de proteína por calle. Los datos son expresados como el valor promedio \pm SEM ($n \geq 3$). ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ respecto al control, *** $p < 0,001$ respecto al tratamiento con STZ.

La activación de Akt depende de las señales provenientes del receptor de insulina y al mismo tiempo está regulada negativamente por fosfatasa, la más importante es la serina-treonina proteína fosfatasa-2A (PP2A). Se ha observado que en los estados resistentes a insulina la inhibición de PP2A podría recuperar la actividad hepática de Akt (Galbo *et al.*, 2013).

En los ratones STZ se encontró una caída en la fosforilación de Akt (Fig. 4) que estaría de acuerdo con estudios realizados en varios tipos celulares demostrando que una exposición crónica a ácidos grasos saturados, ceramidas o altas concentraciones de glucosa llevan a una hiperactivación de PP2A. En hepatocitos, células musculares, endoteliales de la retina y β pancreáticas se ha encontrado un aumento en la actividad de esta fosfatasa relacionada con la aparición de resistencia a insulina y diabetes (Kowluru & Matti, 2012) (Fig. 5).

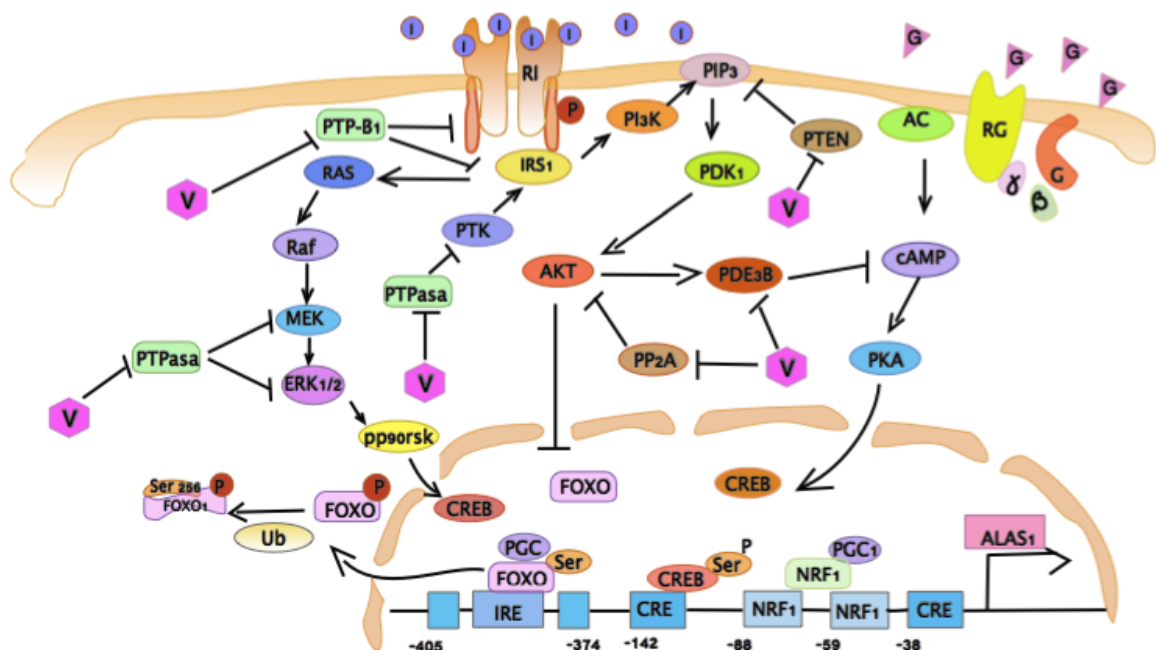


Figura 5 Efecto del estado diabético y el vanadato sobre la expresión del ALA-S1

En los animales diabéticos tratados con insulina o vanadato se encontró un aumento significativo en la fosforilación de Akt en comparación con los controles (Fig. 4). Dado que el vanadato y la insulina no provocaron un incremento en la fosforilación sobre IRS1 llevando a la activación de PI3K/Akt, este resultado podría deberse a una inactivación de PP2A (Fig. 5). Varios estudios indican que la insulina aumenta la fosforilación de la Tyr307 de la subunidad catalítica de PP2A inactivando la enzima mientras que las hormonas contra-reguladoras bloquean este efecto.

Además, el tratamiento de cultivos celulares con ortovanadato de sodio, provoca una caída en la actividad de PP2A en comparación con las células controles. El ortovanadato podría actuar indirectamente inhibiendo una proteína fosfatasa que cataliza la desfosforilación de la Tyr307 (Begum & Ragolia, 1996).

2.5. Efecto de la insulina y el vanadato sobre los niveles nucleares de FOXO1 y PGC-1 α en el hígado de los ratones diabéticos

Akt desempeña un papel clave en la regulación de la actividad transcripcional de FOXO1. Cuando Akt fosforila a FOXO1 interrumpe su unión a PGC-1 α y conduce a su posterior translocación fuera del núcleo (Puigserver *et al.*, 2003).

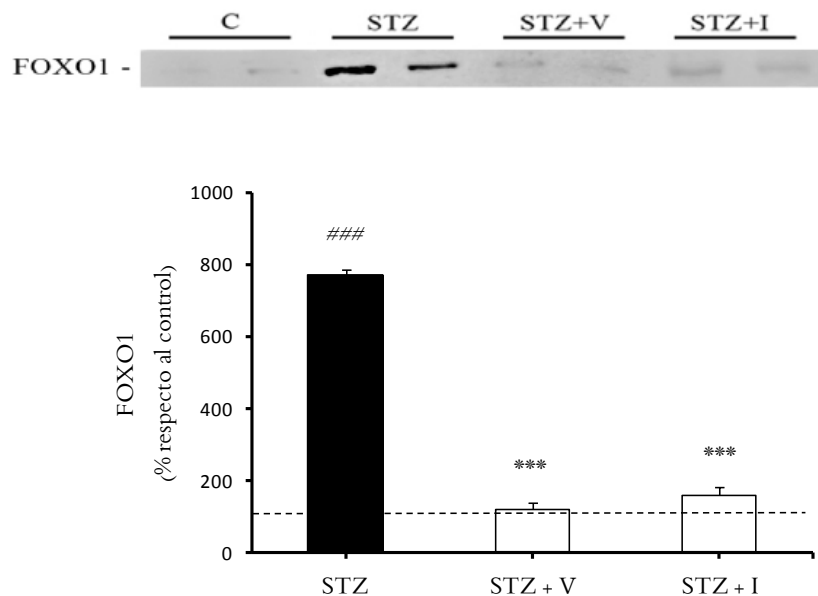


Figure 6 Efecto del vanadato y la insulina sobre la expresión nuclear de FOXO1 en el hígado de los ratones STZ Análisis por Western blot de los niveles de FOXO1. Los datos son expresados como porcentajes de los valores de los animales control (----) al día 32 de administrada la STZ obtenidos con el programa Scion Image. Gel 7 %; 100 μ g de proteína por calle. Los datos son expresados como el valor promedio \pm SEM ($n \geq 3$). ### $p < 0,001$ respecto al control, *** $p < 0,001$ respecto al tratamiento con STZ.

Debido a que en los ratones diabetizados con STZ el tratamiento con insulina y vanadato activó a Akt, se planteó la hipótesis de que estos compuestos suprimen la transcripción del ALA-S1 desencadenando la fosforilación de FOXO1 dependiente de Akt y la subsecuente inactivación del mismo. Con este fin se determinó el contenido de FOXO1 hepático en extractos nucleares provenientes de los distintos grupos experimentales.

A los 32 días de haber sido inyectados con STZ, los niveles nucleares de FOXO1 aumentaron siete veces en los ratones diabéticos (Fig. 6) resultado que está de acuerdo con lo observado por Altomonte *et al.* (2003) en ratones db/db que presentaron una inducción de FOXO1 hepático y un aumento en su localización nuclear en comparación con la camada heterocigota db/+.

La insulina y el vanadato provocaron en los ratones diabéticos una disminución significativa en la acumulación nuclear de FOXO1 (Fig. 6). Estos hallazgos sugieren que en este modelo murino de diabetes la vía Akt/FOXO1 está involucrada en el control de la expresión del ALA-S1.

En la diabetes *mellitus* tipo 1 y 2 se han encontrado niveles aumentados del ARNm de PGC-1 α (Yoon *et al.*, 2001). Estudios previos, realizados *in vivo*, en el hígado e *in vitro* en hepatocitos han demostrado que PGC-1 α es capaz de activar la expresión del gen de ALA-S1 (Handschin *et al.*, 2005). Con el fin de determinar si PGC-1 α juega un papel en la inducción del ARNm del ALA-S1 en este modelo experimental de diabetes, se evaluaron los niveles nucleares de este cofactor en los distintos tratamientos.

En los ratones diabéticos los niveles de PGC-1 α se encontraron significativamente aumentados (Fig. 7), lo que está de acuerdo con lo observado en varios modelos experimentales de diabetes. Estos resultados podrían explicarse por el aumento de FOXO nuclear, ya que el promotor de PGC-1 α contiene tres secuencias consenso IRSs a las que se une FOXO y lleva a su activación (Finck & Kelly, 2006).

Cuando estos animales fueron tratados con insulina o vanadato los niveles de PGC-1 α cayeron en forma significativa sin llegar a los valores del grupo control (Fig. 7). En estos animales los niveles de FOXO1 nuclear alcanzaron el valor control,

indicando que otros mecanismos estarían involucrados en los niveles aumentados de PGC1 α . Se ha demostrado que tanto la insulina (Keeton *et al.*, 2003) como el vanadato (Evangelou, 2002) activan a p38 MAPK. De acuerdo con esto, el tratamiento de los ratones diabéticos con estos compuestos llevaría a una estabilización de la proteína de PGC-1 α a través de una modificación post traduccional (Finck & Kelly, 2006; Wu & Boss, 2007) como es su fosforilación por la p38 MAPK (Wu & Boss, 2007).

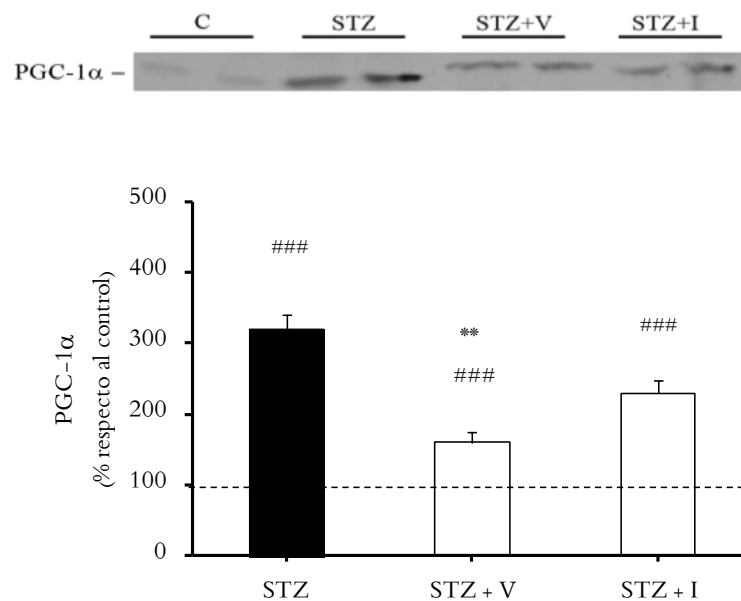


Figure 7 Efecto del vanadato y la insulina sobre la expresión nuclear de PGC-1 α en el hígado de los ratones STZ Análisis por Western blot de los niveles de PGC-1 α . Los datos son expresados como porcentajes de los valores de los animales control (----) al día 32 de administrada la STZ obtenidos con el programa Scion Image. Gel 7 %; 100 μ g de proteína por calle. Los datos son expresados como el valor promedio \pm SEM ($n \geq 3$). ### $p < 0,001$ respecto al control, ** $p < 0,01$ respecto al tratamiento con STZ.

Handschin *et al.* (2005) proponen que durante un ataque de PAI la interacción FOXO1-PGC-1 α aumenta la actividad del ALA-S1. Por lo tanto, teniendo en cuenta el papel descrito para este complejo en la regulación del promotor del ALA-S1 (Handschin *et al.*, 2005) se llevó a cabo la técnica de co-inmunoprecipitación con el fin de comprobar si variaciones en los niveles nucleares de dicho complejo podrían ser los responsables de las alteraciones observadas en la expresión del ALA-S1.

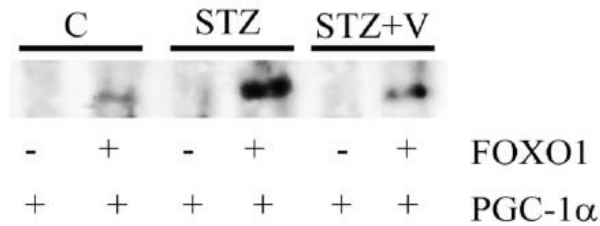


Figure 8 Inmunoprecipitación de extractos nucleares del hígado de los ratones STZ tratados con vanadato Análisis por Western blot de los extractos de proteínas nucleares sujetas a inmunoprecipitación empleando el anticuerpo anti-FOXO1 y marcados con el anticuerpo anti-PGC-1 α como se describe en Materiales y Métodos.

Cuando los extractos nucleares se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-FOXO1 e inmunomarcaron con anticuerpos anti-PGC-1 α , se observó en el grupo STZ un aumento del complejo nuclear FOXO1-PGC-1 α que disminuyó por la administración de vanadato (Fig. 8). Estos resultados se correlacionan con los niveles de ARNm del ALA-S1 encontrados en el grupo STZ+V sugiriendo que el efecto observado sobre la expresión del ALA-S1 en ambos grupos experimentales, podría estar mediado por cambios en los niveles nucleares del complejo FOXO1-PGC-1 α .

2.6. Estudio del factor de transcripción NRF-1 en los animales diabéticos y en los grupos tratados con insulina y vanadato

NRF-1 es un factor que regula positivamente la transcripción de sus genes blanco uniéndose como homodímero a sitios de reconocimiento palindrómicos. Es fosforilado en múltiples residuos Ser en su región amino-terminal aumentando su unión al ADN y su actividad trans activadora (Scarpulla, 2006).

Varios autores han demostrado que PGC-1 α y PGC-1 β son coactivadores de NRF-1 (Handschin *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2010) y que un aumento en el nivel de expresión de PGC lleva a una mayor transcripción del gen de NRF-1 (Wu *et al.*, 1999).

Debido a que el promotor del ALA-S1 contiene dos sitios de unión para NRF-1 (Braidotti *et al.*, 1993) (Fig. 5) y que en todos los grupos experimentales estudiados en el presente trabajo los valores de PGC-1 α se encontraron significativamente

aumentados con respecto al grupo control se determinaron los niveles nucleares NRF-1 con el fin de estudiar su participación en la regulación de esta enzima.

Cuando se cuantificaron los niveles de NRF-1 contrariamente a lo esperado se observó una caída del 30 % en los animales que recibieron vanadato en comparación al grupo control (Fig. 9).

En la Fig. 1 se observa que el vanadato provocó una caída significativa del ARNm del ALA-S1, por debajo del control, en comparación con el efecto inhibitorio causado por la insulina este resultado podría atribuirse a la disminución en los niveles de NRF-1 provocada por el vanadato.

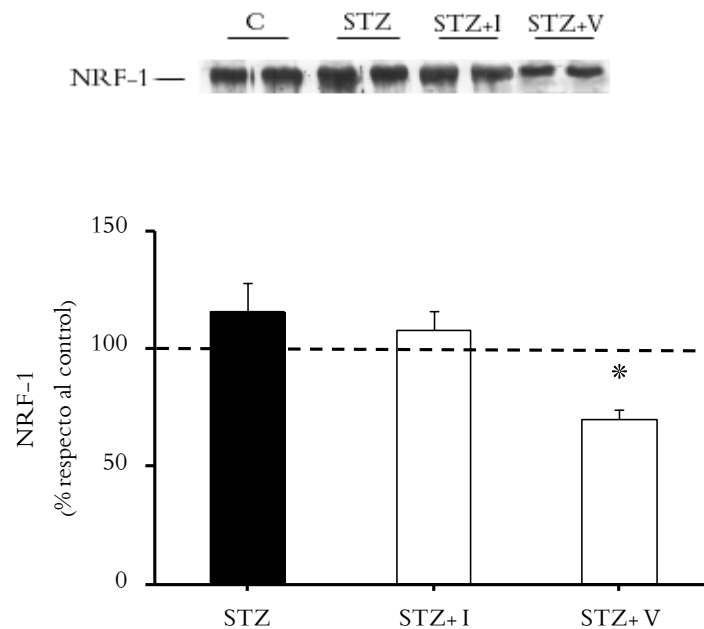


Figura 9 Efecto del vanadato y la insulina sobre la expresión nuclear de NRF-1 en el hígado de los ratones STZ Análisis por Western blot de los niveles de NRF-1. Los datos son expresados como porcentajes de los valores de los animales control (-----) al día 32 de administrada la STZ obtenidos con el programa Scion Image. Gel 7 %; 45 µg de proteína por calle. Los datos son expresados como el valor promedio ± SEM (n≥3). *p<0,01 respecto al control.

Considerando que PGC-1α puede coactivar a FOXO1 y a NRF-1 para inducir la transcripción del ALA-S1 el vanadato ejercería su efecto sobre el ARNm del

ALA-S1 provocando una caída tanto en los niveles de NRF-1 como en la formación del complejo FOXO1- PGC-1 α .

2.7. Efecto de la insulina y vanadato sobre los niveles de AMPc, Erk1/2 y el factor de transcripción CREB en el hígado de los animales diabéticos

Como se describió en la Introducción, Capítulo. 3, el AMPc induce el gen del ALA-S1 a través de la vía PKA/CREB (Giono *et al.*, 2001) y la insulina lo reprime a través de la activación de Erk1/2/pp90^{RSK} y Akt (Scassa *et al.*, 2001).

Sabiendo que existe una interrelación entre las vías de AMPc y Erk1/2, que tienen como blanco común a CREB, y considerando la importancia de CREB en la regulación del gen del ALA-S1 el objetivo fue determinar la participación de ambas vías a través de los niveles de AMPc, fosforilación de Erk1/2, y P-CREB en los animales STZ, STZ+V y STZ+I.

Cuando se determinaron los niveles de AMPc en los animales diabéticos en el día 32, éstos se encontraron cercanos a los correspondientes al grupo control (61 picomol/gr tejido). Estos resultados sugieren que en el estado diabético el AMPc no participaría en el aumento observado en la expresión del ARNm del ALA-S1 debido a que no se observó una correlación entre los niveles del nucleótido y los del ARNm del ALA-S1. Sin embargo, en los animales diabéticos tratados con insulina o vanadato los niveles del AMPc se encontraron por debajo del grupo control (Fig. 10), coincidiendo con la expresión disminuida de ARNm del ALA-S1 observada en ambos tratamientos. La caída del AMPc podría deberse a la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) y/o activación de fosfodiesterasas como PDE3B. Se sabe que Akt modula los niveles de AMPc por activación de la PDE3B (Watanabe *et al.*, 2004). Como se demostró anteriormente (Fig. 4), en los ratones STZ la fosforilación de la Ser473 de Akt se encontró disminuida, mientras que la insulina y el vanadato provocaron un aumento en la fosforilación de la misma. Por lo tanto de acuerdo con estos resultados la caída en los niveles de AMPc en ambos tratamientos podría atribuirse a una activación de PDE3B más que a una inactivación de la AC.

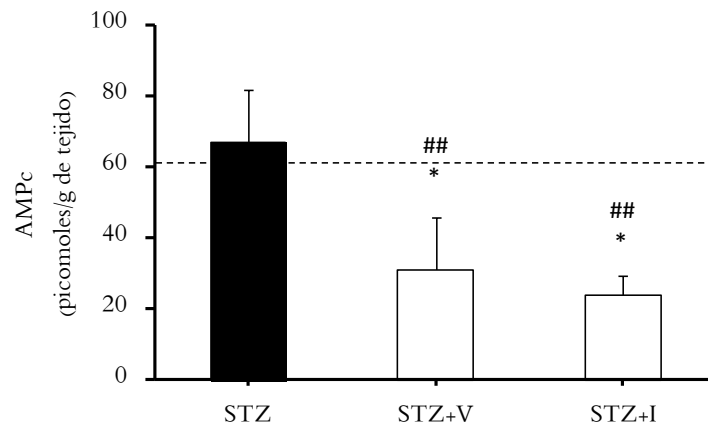


Figura 10 Efecto del vanadato y la insulina los niveles de AMPc en el hígado de los ratones STZ Determinación de la concentración de AMPc en los animales controles (----), diabéticos y tratados con I y V a los 32 días de iniciado el tratamiento con STZ. Los datos son expresados como el valor promedio \pm SEM ($n \geq 3$). * $p < 0,05$ respecto al control, ## $p < 0,01$ respecto al tratamiento con STZ.

Cuando se cuantificaron los niveles de fosforilación de Erk1/2 en los animales diabéticos y tratados con insulina, éstos se encontraron significativamente aumentados en comparación con el grupo control (Fig. 11). El aumento en la fosforilación de Erk1/2 observado en los ratones diabéticos podría deberse a los niveles elevados de glucosa encontrados en estos ratones actuando a través de su sola presencia o por medio de los receptores de AGEs (RAGEs). Se sabe que las perturbaciones osmóticas derivadas de la presencia de altas concentraciones de glucosa, el estrés oxidativo inducido por glucosa y las proteínas circulantes glicosiladas no enzimáticamente (AGEs) actuando a través de los RAGEs activan la vía de las MAPKs (Manna *et al.*, 2010). Por otra parte, el aumento de la fosforilación de Erk1/2 en el grupo STZ+I está de acuerdo con otros autores que demostraron *in vitro* que la insulina activa la vía de las MAPK (Scassa *et al.*, 2001; Vardatsikos *et al.*, 2009).

En los animales tratados con vanadato, se observó una disminución en la fosforilación de Erk1/2 en comparación con el grupo control (Fig. 11). Es importante destacar que esta caída significativa se debe a una disminución en la fosforilación de Erk1/2 y a un aumento en los niveles nucleares de su proteína (Fig. 11). Al normalizarse según el contenido de su proteína, la fosforilación de Erk1/2 da como

resultado una caída significativa en el estado basal en los animales STZ tratados con vanadato (62 %) cuando se los compara con el grupo control.

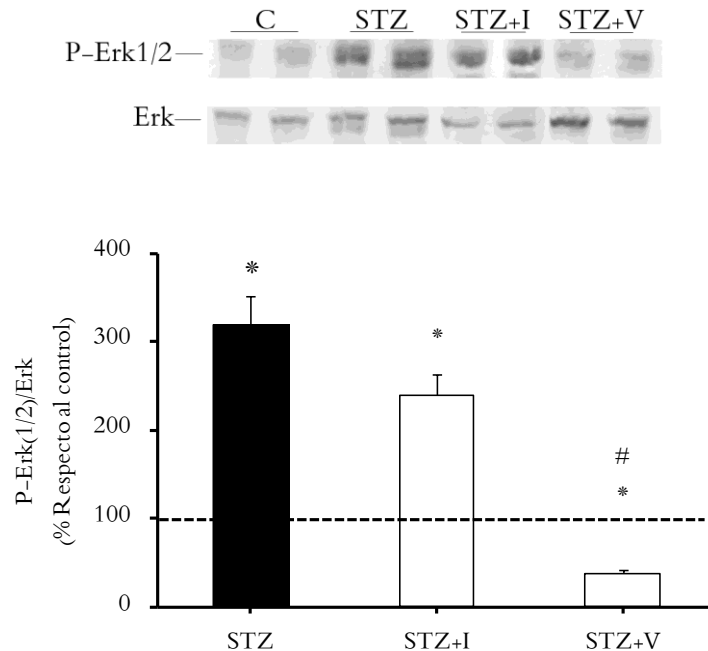


Figura 11 Efecto del vanadato y la insulina sobre la expresión nuclear de P-Erk1/2 y Erk1/2 en el hígado de los ratones STZ Análisis por Western blot de los niveles de P-Erk1/2 y Erk1/2 en núcleo. Los datos son expresados como porcentajes de los valores de los animales control (----) al día 32 obtenidos con el programa Scion Image. Gel 12 %; 45 μ g de proteína por calle. Los datos son expresados como el valor promedio \pm SEM ($n \geq 3$). # $p < 0,1$ respecto al tratamiento con STZ, * $p < 0,1$ respecto al control.

Estudios *in vitro*, realizados en varios tipos celulares han demostrado que los compuestos del vanadio estimulan la fosforilación y activación de Erk1/2 (Volmat *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2004; Mehdi *et al.*, 2006). Para que Erk1/2 se acumule en el núcleo es imprescindible una estimulación persistente y duradera que permita la síntesis *de novo* de proteínas de vida corta, fosfatasa de tirosina y/o de especificidad dual, que actúan como anclas nucleares de Erk. Durante una inducción a largo plazo, el pool nuclear activo de Erk1/2 fosforilado disminuye progresivamente y la proteína inactiva se almacena masivamente en el núcleo (Volmat *et al.*, 2001). Considerando estas observaciones, el resultado encontrado en el grupo STZ+V indicaría que un tratamiento prolongado con este compuesto llevaría a un aumento en la fosforilación de Erk1/2, su posterior ingreso en el núcleo, su desfosforilación y finalmente su retención nuclear.

Sin embargo cuando se cuantificaron los niveles de CREB y P-CREB, se observó que en todos los grupos estudiados éstos se mantuvieron como en los animales controles (Fig. 12). Estos resultados sugieren que estas vías no estarían influyendo sobre la activación y/o inhibición del factor de transcripción CREB.

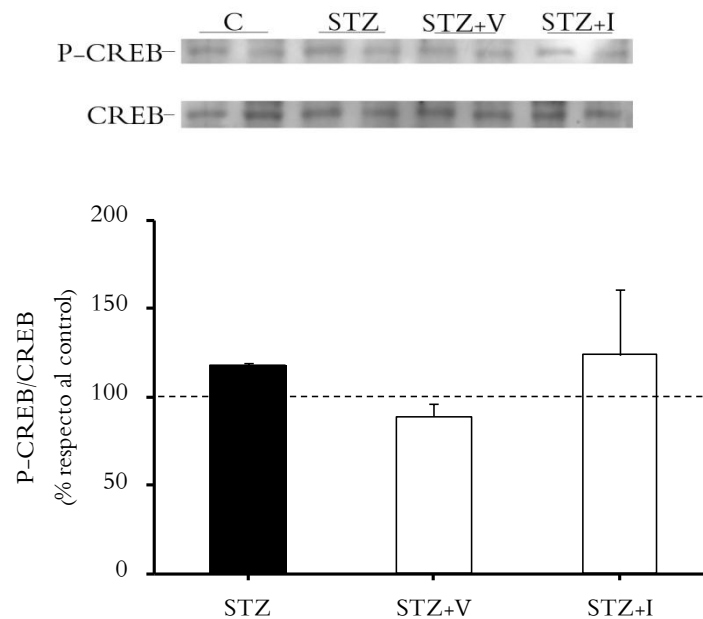


Figura 12 Efecto del vanadato y la insulina sobre la expresión nuclear de P-CREB y CREB en el hígado de los ratones STZ Análisis por Western blot de los niveles de P-CREB y CREB nucleares. Los datos son expresados como porcentajes de los valores de los animales control (----) al día 32 obtenidos con el programa Scion Image. Gel 10 %; 45 μ g de proteína por calle. Los datos son expresados como el valor promedio \pm SEM ($n \geq 3$).

Considerando los presentes resultados experimentales se puede concluir que en la diabetes los niveles de ARNm y proteína del ALA-S1 se encuentran inducidos y que tanto la insulina como el vanadato revierten este efecto. La acción del vanadato sobre la expresión del ALA-S1 se debe a una caída en la formación del complejo PGC-1 α -FOXO1 (Fig. 8) y a una caída en los niveles del factor NRF-1 (Fig. 9). Por lo tanto, estos hallazgos abren la posibilidad de considerar a los compuestos de vanadio como nuevos y alternativos agentes terapéuticos en el tratamiento de la PAI.

2.8. Bibliografía

- ✓ Ahmadi S., Karimian S., Sotoudeh M., Bahadori M. & Dehghani G. (2010) Pancreatic islet beta cell protective effect of oral vanadyl sulphate in streptozotocin-induced diabetic rats, an ultrastructure study. *Pak. J. Biol. Sci.* **13(23)**: 1135-1140.
- ✓ Altomonte J., Richter A., Harbaran S., Suriawinata J., Nakae J. *et al.* (2003) Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285(4)**: 718-728.
- ✓ Begum N. & Ragolia L. (1996) cAMP counter-regulates insulin-mediated protein phosphatase-2A inactivation in rat skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **271(49)**: 31166-31171.
- ✓ Boura-Halfon S. & Zick Y. (2009) Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296(4)**: E581-E591.
- ✓ Braidotti G., Borthwick I. & May B. (1993). Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinic synthase from rat. *J. Biol. Chem.* **268**: 1109-1117.
- ✓ Esposito D., Li Y., Cama A. & Quon M. (2001) Tyr(612) and Tyr(632) in human insulin receptor substrate-1 are important for full activation of insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and translocation of GLUT4 in adipose cells. *Endocrinology.* **142(7)**: 2833-2840.
- ✓ Evangelou A. (2002) Vanadium in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **42(3)**: 249-265.
- ✓ Finck B. & Kelly D. (2006) PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J. Clin. Invest.* **116(3)**: 615-622.
- ✓ Fritsche L., Weigert C., Häring H. & Lehmann R. (2008) How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver- Implications for health and disease. *Curr. Med. Chem.* **15(13)**: 1316-1329.

- ✓ Galbo T., Perry R., Nishimura E., Samuel V., Quistorff B. *et al.* (2013) PP2A inhibition results in hepatic insulin resistance despite Akt2 activation. *Aging (Albany NY)*. **5(10)**: 770-781.
- ✓ Giono L., Varone C. & Cánepa E. (2001) 5-Aminolaevulinate synthase gene promoter contains two cAMP-response element (CRE)-like sites that confer positive and negative responsiveness to CRE-binding protein (CREB). *Biochem. J.* **353(Pt 2)**: 307-316.
- ✓ Handschin C., Lin J., Rhee J., Peyer A., Chin S. *et al.* (2005) Nutritional regulation of hepatic haem biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha. *Cell*. **122**: 505-515.
- ✓ Heyliger C., Tahiliani A. & McNeill J. (1985) Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science*. **227**: 1474-1477.
- ✓ Inoue G., Cheatham B. & Kahn C. (1996) Different pathways of postreceptor desensitization following chronic insulin treatment and in cells overexpressing constitutively active insulin receptors. *J. Biol. Chem.* **271(45)**: 28206-28211.
- ✓ Keeton A., Bortoff K., Bennett W., Franklin J., Venable D. *et al.* (2003) Insulin-regulated expression of Egr-1 and Krox20: dependence on ERK1/2 and interaction with p38 and PI3-kinase pathways. *Endocrinology*. **144(12)**: 5402-5410.
- ✓ Kido Y., Nakae J. & Accili D. (2001) Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86(3)**: 972-979.
- ✓ Kowluru A. & Matti A. (2012) Hyperactivation of protein phosphatase 2A in models of glucolipotoxicity and diabetes: potential mechanisms and functional consequences. *Biochem. Pharmacol.* **84(5)**: 591-597.
- ✓ Manna P., Das J., Ghosh J., & Sil P. (2010) Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, IkappaBalpha/NF-kappaB, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways:

Prophylactic role of arjunolic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **48(11)**: 1465-1484.

- ✓ Mehdi M. & Srivastava A. (2005) Organo-vanadium compounds are potent activators of the protein kinase B signaling pathway and protein tyrosine phosphorylation: mechanism of insulinomimesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **440(2)**: 158-164.
- ✓ Mehdi M., Pandey S., Théberge J. & Srivastava A. (2006) Insulin signal mimicry as a mechanism for the insulin-like effects of vanadium. *Cell. Biochem. Biophys.* **44(1)**: 73-81.
- ✓ Meyerovitch J., Farfel Z., Sack J. & Shechter Y. (1987) Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin-treated rats. Characterization and mode of action. *J. Biol. Chem.* **262**: 6658-6662.
- ✓ Pederson T., Kramer D. & Rondinone C. (2001) Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. *Diabetes.* **50(1)**: 24-31.
- ✓ Puigserver P., Rhee J., Donovan J., Walkey C., Yoon J. *et al.* (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature.* **423**: 550-555.
- ✓ Scarpulla R. (2006) Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J. Cell. Biochem.* **97(4)**: 673-683.
- ✓ Scassa M., Varone C., Montero L. & Cánepa E. (1998) Insulin inhibits delta-aminolevulinate synthase gene expression in rat hepatocytes and human hepatoma cells. *Exp. Cell. Res.* **244**: 460-469.
- ✓ Scassa M., Guberman A., Varone C. & Cánepa E. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for the regulation of 5-aminolevulinate synthase gene expression by insulin. *Exp. Cell. Res.* **271(2)**: 201-213.
- ✓ Scassa M., Guberman A., Ceruti J. & Cánepa E. (2004) Hepatic nuclear factor 3 and nuclear factor 1 regulate 5-aminolevulinate synthase gene

expression and are involved in insulin repression. *J. Biol. Chem.* **279**: 28082-28092.

- ✓ Shao D., Liu Y., Liu X., Zhu L., Cui Y., *et al.* (2010) PGC-1 beta-regulated mitochondrial biogenesis and function in myotubes is mediated by NRF-1 and ERR alpha. *Mitochondrion.* **10(5)**: 516-527.
- ✓ Srivastava A. & Mehdi M. (2005) Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabet. Med.* **22**: 2-13.
- ✓ Vardatsikos G., Mehdi M. & Srivastava A. (2009) Bis(maltolato)-oxovanadium (IV)-induced phosphorylation of PKB, GSK-3 and FOXO1 contributes to its glucoregulatory responses. *Int. J. Mol. Med.* **24**: 303-309.
- ✓ Volmat V., Camps M., Arkinstall S., Pouysségur J. & Lenormand P. (2001) The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *J. Cell. Sci.* **114(Pt 19)**: 3433-3443.
- ✓ Watanabe T., Satoo H., Kohara K., Takami R., Motoyashiki T. *et al.* (2004) Orthovanadate stimulates cAMP phosphodiesterase 3 activity in isolated rat hepatocytes through mitogen-activated protein kinase activation dependent on cAMP-dependent protein kinase. *Biol. Pharm. Bull.* **27(6)**: 789-796.
- ✓ Wu Z., Puigserver P., Andersson U., Zhang C., Adelmant G. *et al.* (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* **98(1)**: 115-124.
- ✓ Wu Z. & Boss O. (2007) Targeting PGC-1 alpha to control energy homeostasis. *Expert. Opin. Ther. Targets.* **(10)**: 1329-1338.
- ✓ Yoon J., Puigserver P., Chen G., Donovan J., Wu Z. *et al.* (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature.* **413**: 131-138.

Capítulo 3

EFEECTO DEL VANADATO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA FERROQUELATASA

en un modelo murino de diabetes *mellitus* tipo 1

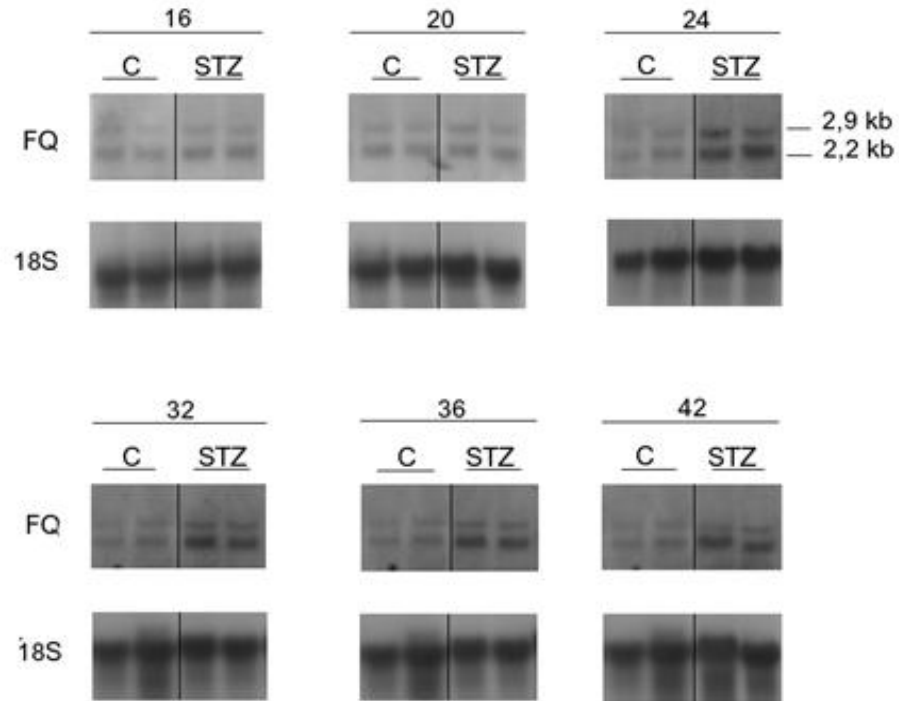
Recordemos que el último paso en la vía biosintética del hemo ocurre en la mitocondria y está mediado por la ferroquelatasa (FQ) (Tephly *et al.*, 1971), enzima que cataliza la inserción del Fe^{+2} en la protoporfirina IX para formar protohemo. Evidencias previas sugieren entonces que además del ALA-S1, la FQ también es una enzima reguladora de la vía de la biosíntesis del hemo (Tephly *et al.*, 1971; Cánepa *et al.*, 1985, 1992).

Tephly *et al.*, (1971) habían propuesto, que ambas actividades están recíprocamente relacionadas y que el aumento en la actividad de la FQ se debe a un incremento en el flujo de sustrato provocado por una mayor actividad del ALA-S1. Además, estudios realizados en ratas normales (Cánepa *et al.*, 1984, 1985, 1992) demostraron que la glucosa inhibe o previene la inducción mediada por drogas de la FQ hepática.

En los Capítulos 1 y 2 (Resultados) se ha establecido que existe una relación entre la expresión del ALA-S1 y la insulina y en el Capítulo 2 (Resultados) se ha demostrado que las sales de vanadio regulan la expresión del ALA-S1 en un modelo murino de diabetes tipo 1. En base a estos datos se estudiará el comportamiento de la FQ en este modelo con el fin de evaluar si esta enzima cumple un papel regulatorio en la vía biosintética del hemo y se valorará el efecto del vanadato sobre la misma.

3.1. Niveles de expresión del ARNm de la FQ en animales diabéticos en función del tiempo

A



B

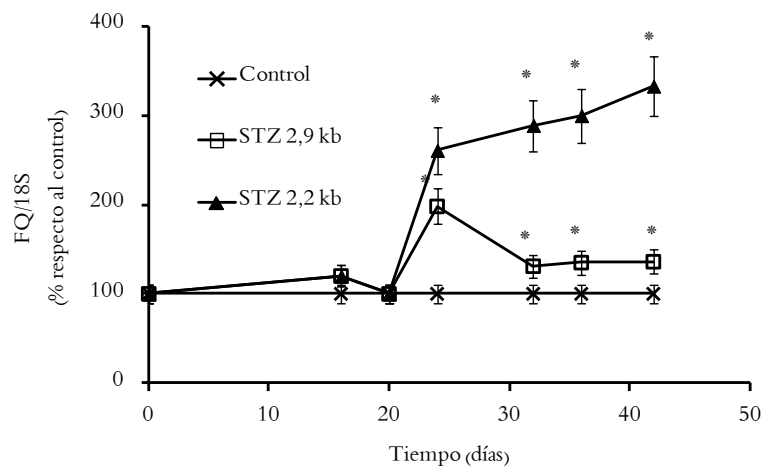


Figura 1 Niveles de expresión del ARNm de la FQ en el hígado de los animales diabéticos en función del tiempo (A) Comenzando el día 16 luego de la inyección *i.p.* de STZ, las muestras de ARNm de hígado fueron tomadas a diferentes tiempos (16, 20, 24, 32, 36, 42 días) y los niveles del ARNm de la FQ fueron analizados por Northern blot. (B) Los datos son expresados como porcentaje de los valores de los animales controles al día 16. Los datos son expresados como valor medio \pm SEM ($n \geq 3$). * $p < 0,05$.

En modelos experimentales de PAI se comprobó que el aumento en la actividad del ALA-S1 y de la FQ (Cánepa *et al.*, 1984, 1985) fue acompañado por un aumento en el ARNm de ambas enzimas (Cánepa *et al.*, 1992). Debido a que en nuestro modelo murino de diabetes *mellitus* tipo 1 se observó un incremento en los niveles de ARNm del ALA-S1 hepática en función del tiempo (Capítulo 1; Resultados; Fig. 4) se evaluó el comportamiento del ARNm de la FQ en las mismas condiciones, con el fin de verificar si el estado diabético también afectó la expresión de esta enzima.

A los 24 días de haber sido inyectados con el agente diabetizante, la expresión hepática de ambos ARNm (Fig. 1), el de 2,2 kb eritroide y el de 2,9 kb no eritroide, aumentaron un 160 % y un 100 % respectivamente. El ARNm eritroide continuó incrementándose hasta el final del ensayo mientras que el no eritroide cayó un 70% sin alcanzar el valor del grupo control (Fig. 1B). De acuerdo con estos resultados el estado diabético alteró la expresión de ambos ARNms.

3.2. Efecto del vanadato sobre la expresión del ARNm y la proteína de la FQ en los animales diabéticos

Teniendo en cuenta que el estado diabético provocó una desregulación de la expresión de FQ, se estudió el efecto del vanadato sobre la transcripción de su ARNm.

En los ratones diabéticos se observó que el vanadato suprimió la inducción de ambos ARNms (Fig. 2). Estos resultados sugieren, que al igual que con el ALA-S1, este compuesto también ejerce un efecto sobre la inducción del ARNm de la FQ.

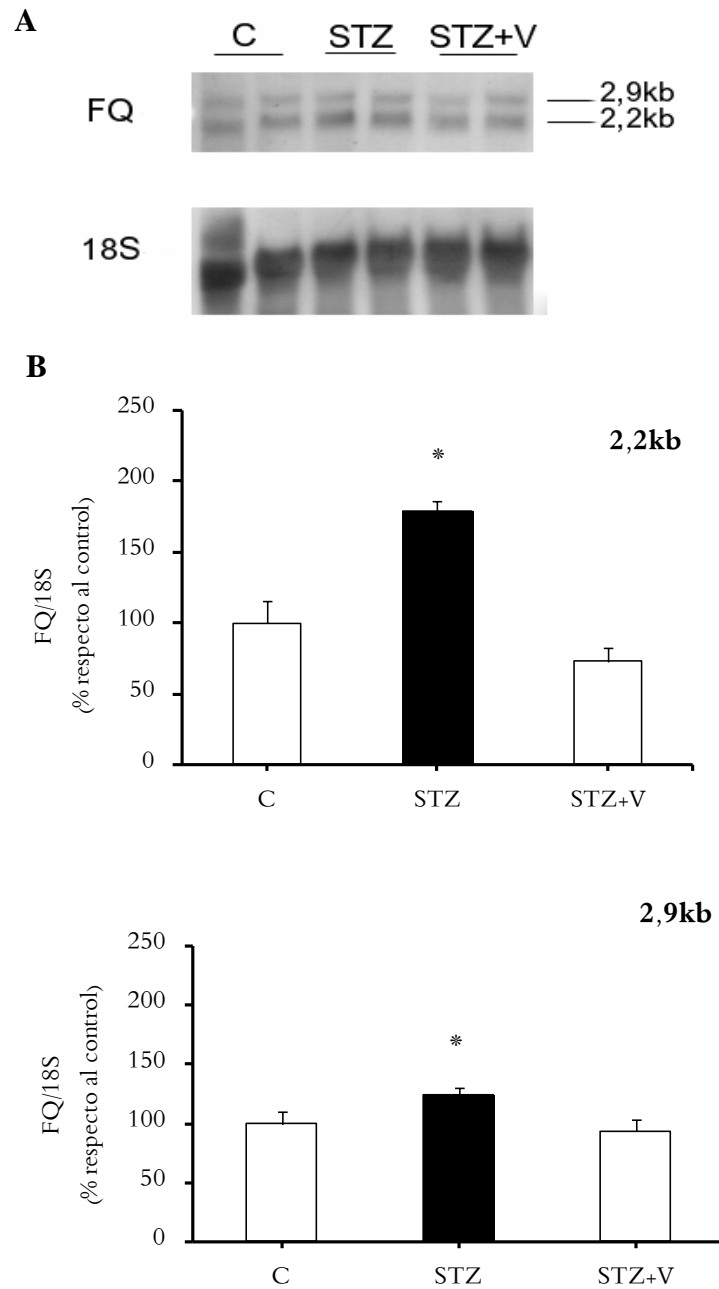
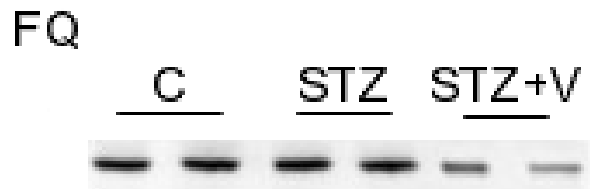


Figura 2 Efecto del vanadato sobre el ARNm de la FQ (A) Los niveles de ARNm de la FQ fueron determinados por análisis de Northern blot y las membranas fueron hibridizadas con una sonda específica para el ARNm de la FQ. Como control de carga se utilizó una sonda específica para el ARN 18S. **(B)** Los datos son expresados como porcentaje de los valores de los animales controles al día 32 obtenidos por el programa Scion Image. Los datos son expresados como valor medio \pm SEM ($n \geq 3$). * $p < 0,01$ respecto al control, # $p < 0,01$ respecto al tratamiento con STZ.

Considerando que tanto el estado diabético como la administración de vanadato afectaron la expresión de los ARNm de la FQ, se determinaron los niveles de su proteína en todos los grupos estudiados.

A



B

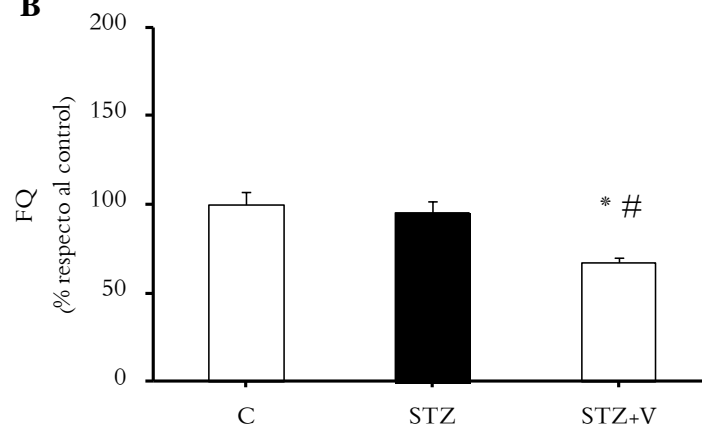


Figura 3 Efecto del vanadato sobre el contenido de proteína de la FQ (A) Los niveles de proteína de la FQ fueron determinados por Western blot con un anticuerpo policlonal como se describe en Materiales y Métodos. Como control de carga se sembró en todas las calles la misma cantidad (50µg) de proteína. Gel 10 % **(B)** Los datos son expresados como porcentaje de los valores de los animales controles al día 32 de administrada la STZ obtenidos por el programa Scion Image. Los datos son expresados como valor medio \pm SEM ($n \geq 3$). *P < 0,001 respecto al control, #P < 0,001 respecto al tratamiento con STZ.

Los niveles de proteína en los ratones diabéticos no se ven alterados mientras que en el grupo STZ+V cayeron en forma significativa respecto al grupo control (Fig. 3B). Es interesante destacar la ausencia de correlación entre los niveles de ARNm y proteína de los grupos estudiados. Hallazgos similares han sido descriptos por otros autores que observaron durante el desarrollo hematopoyético, en células stem de ratón de la línea BK4, que los niveles de ARNm aumentaron significativamente sin alterar los niveles de proteína (Magness *et al.*, 2000). En el

mismo sentido, Crooks *et al.* (2010) observaron que las células MEL tratadas con DMSO, cuando son depletadas de hierro sufren una caída en los niveles de proteína de FQ aunque no se observa ningún cambio en los niveles de ARNm. También se observó que el tratamiento con quelantes de hierro en las células humanas de eritroleucemia K562 y células Cos7 que expresan FQ humana, provoca una disminución en la cantidad de proteína, sin afectar los niveles de su ARNm (Crooks *et al.*, 2010). Nuestros resultados así como los descritos por estos autores muestran una disociación entre los niveles de ARNm y proteína lo que sugiere la existencia de mecanismos de control traduccional o postraduccional en la expresión de la FQ.

3.2.1 Influencia del metabolismo del hierro sobre la traducción de la FQ

Varios autores han demostrado que la estabilidad de la FQ está influenciada significativamente por la disponibilidad de los “clústers” [2Fe-2S], la biogénesis de los cuales depende tanto de la accesibilidad continua de hierro así como de una maquinaria de ensamblaje funcional (Crooks *et al.*, 2010).

En la regulación de la absorción de hierro en el hígado, participa el sistema elemento que responde a hierro (IRE)/proteína regulada por hierro (IRP). La expresión de los genes regulada a través de IRE, como son el receptor de transferrina 1 (TfR1), la ferritina y el transportador de iones de metal divalente 1 (DMT1), se encuentra modulada por los niveles hepáticos de hierro (Silva *et al.*, 2012) (Fig. 4).

El ARNm del TfR1 contiene cinco IREs en su extremo 3'UTR esenciales para la regulación de su expresión dependiente del nivel de hierro intracelular quelable. En condiciones de deficiencia de hierro, IRP1 e IRP2 se unen con alta afinidad a los IRES del ARNm del TfR1 protegiéndolo de la degradación por endonucleasas (Wilkinson & Pantopoulos, 2014) y aumentando la expresión de proteínas del TfR1 (Crooks *et al.*, 2010). Por el contrario, en las células repletas de hierro disminuye la unión de IRP1 e IRP2 a las IREs, permitiendo la degradación del ARNm del TfR1 e inhibiendo la posterior absorción de hierro (Wilkinson & Pantopoulos, 2014) (Fig. 4).

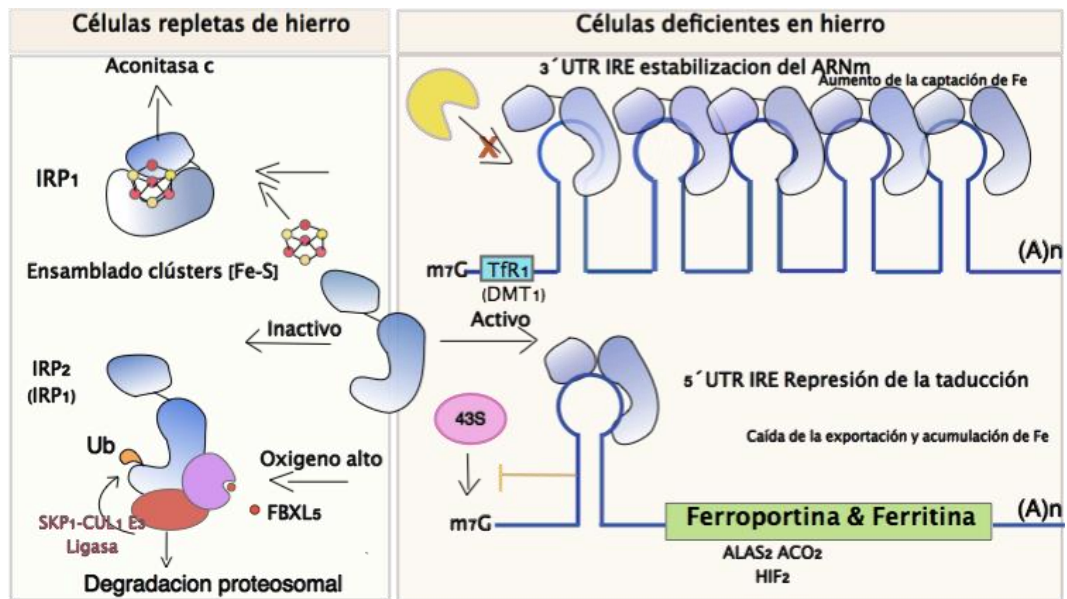


Figura 4 Regulación del hierro celular proteína regulada por hierro 1 (IRP1); ubiquitina (Ub); receptor de transferrina 1 (TfR1); elementos de respuesta a hierro (IREs); regiones no traducidas (UTRs); F-box sensora de hierro (FBXL5); complejo de ligasa (SKP1-CUL1 E3); delta-aminolevulinato sintetasa eritroide específica (ALAS2); aconitasa mitocondrial (ACO2); factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF2 α); transportador de metales divalente 1 (DMT1)

Por lo tanto, como evaluación indirecta de los niveles intracelulares de Fe hepático, se determinaron por qRT-PCR los niveles de expresión del ARNm de TfR1 en los animales diabéticos y tratados con vanadato.

En los ratones STZ la expresión del ARNm del TfR1 hepático fue 1,32 veces mayor que en los animales controles, mientras que en grupo tratado con vanadato los niveles fueron similares al grupo control (Fig. 5).

Este aumento del ARNm del TfR1 observado en los ratones STZ sugiere una disminución en los niveles de Fe intracelular y concuerda con lo hallado en el hígado, riñón y miocardio de ratas diabetizadas con STZ donde la expresión del ARNm del TfR1 se encontró aumentada con respecto a los animales controles (Silva *et al.*, 2012). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis propuesta para explicar nuestros resultados, donde la caída de hierro hepático, llevaría a una caída en el pool de los "clústers" de [2Fe-2S] y como consecuencia a la degradación de la proteína de FQ que se traduce *de novo*, sin modificar los niveles de la proteína madura. Por lo tanto,

en los ratones STZ los niveles de la proteína de la FQ permanecen como en los animales controles a pesar de que existe un aumento en el ARNm.

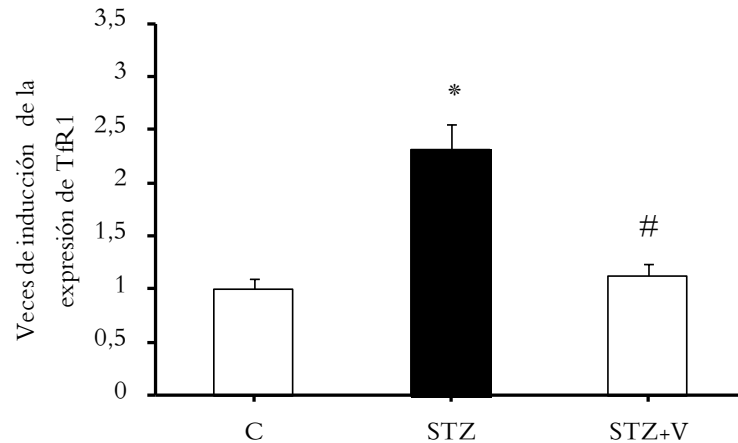


Figura 5 Efecto del STZ y el vanadato sobre los niveles de expresión hepática del ARNm del Tfr1 Los niveles de expresión del ARNm del Tfr1 relativa a actina fueron determinados por la técnica de qRT-PCR. Los datos son expresados como veces de inducción con respecto a los controles al día 32 de administrada la STZ y como valor medio \pm SEM ($n \geq 3$). * $P < 0,1$ respecto al control; # $P < 0,1$ respecto al tratamiento con STZ.

Debido a que los niveles de Tfr1 en el grupo STZ+V se encuentran como en el grupo control (Fig. 5) la caída en los niveles de proteína de la FQ por debajo del valor control, en presencia de vanadato, no se debería a una falta de hierro hepático, si no que se tendría que considerar la participación de otros mecanismos.

3.3. Efecto del vanadato sobre la regulación transcripcional del ARNm de la FQ en un modelo de diabetes *mellitus* tipo 1-glicosilación de Sp1

La estructura general del gen de la FQ de ratón es similar al gen humano (Taketani *et al.*, 1999). Ensayos de transfección transitoria *in vitro* en varias líneas celulares humanas han demostrado que una porción mínima del promotor que contiene el sitio de unión para el factor de transcripción Sp1, es necesaria para la expresión de la FQ y es suficiente para conferir una expresión eritroide preferencial (Di Pierro *et al.*, 2005).

Debido a que el promotor de la FQ contiene sitios de unión a Sp1 y que existe una relación entre la hiperglucemia y la expresión génica a través de la modulación de dichos sitios, se estudiaron los efectos del estado diabético y del agente insulino-mimético vanadato, sobre la O-GlcNacilación de Sp1.

En los animales diabéticos los niveles de Sp1 no se modificaron mientras que los de su forma O-glicosilada se encontraron aumentados en comparación con los animales controles (Fig. 6B). Se ha observado que un aumento de flujo de glucosa a través de la vía de las hexosaminas, como ocurre en los pacientes diabéticos, es acompañado por un incremento en la O-GlcNacilación y en la actividad transcripcional *in vitro* de Sp1 (Hart *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que el aumento observado en el ARNm de FQ se debería a un aumento en la actividad transcripcional de Sp1.

En los animales diabéticos como en los controles, el vanadato disminuyó tanto la O-GlcNacilación inducida por STZ como la basal respectivamente (Fig. 6B), afectando los niveles basales de la proteína de Sp1 que no se recuperaron a valores normales (Fig. 6B). Estos resultados, estarían de acuerdo con lo reportado en estudios *in vitro* que indican que el vanadato inhibe la actividad de la O-ligando b-N-acetilglucosamina transferasa (OGT), enzima responsable de la O-glicosilación de Sp1 (Marshall & Okuyama, 2004). La actividad de OGT está fuertemente regulada por varios factores como la disponibilidad de sustrato, la interacción proteína-proteína y modificaciones post traduccionales. La inactivación funcional de OGT lleva a una disminución concomitante de la O-GlcNacilación de Sp1 y posiblemente a un aumento en su fosforilación lo que regularía su actividad como factor de transcripción (Majumdar *et al.*, 2006). Además, un aumento en la O-glicosilación de Sp1 está asociada con una disminución en su fosforilación y una inhibición en su degradación proteosomal mientras que cuando Sp1 se encuentra hipoglicosilado, es rápidamente degradado (Tan & Khachigian, 2009), esto explicaría la caída en los niveles de proteína de Sp1 en los ratones tratados con vanadato.

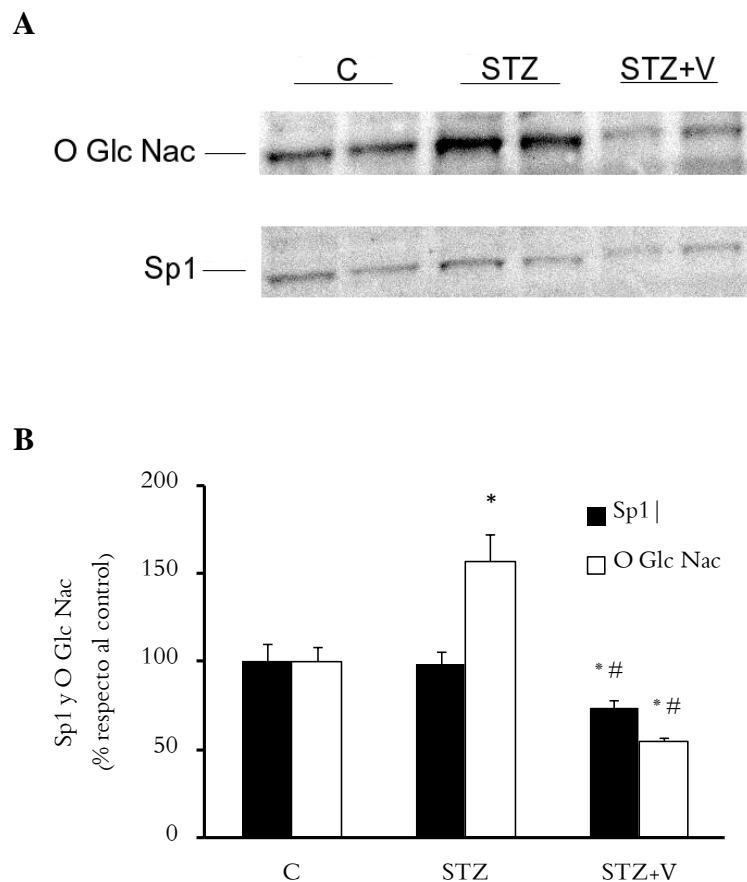


Figura 6 Niveles de Sp1 y su forma O-GlcNac glicosilada en los animales diabéticos y los tratados con vanadato (A) Se ensayaron por Western blot los niveles de Sp1 y su forma O-GlcNac glicosilada en los diferentes tratamientos. Gel 6,5 %; 90 µg de proteína por calle **(B)** Los datos son expresados como porcentaje de los valores de los animales controles al día 32 de administrada la STZ obtenidos por el programa Scion Image: *P < 0,001 diferencia significativa con respecto al control, # P < 0,001 diferencia significativa con respecto al tratamiento con STZ.

La glicosilación de Sp1 puede estimular o reprimir su unión al ADN y por lo tanto la transcripción (Tan & Khachigian, 2009)

Debido a que en los distintos tratamientos se observó una alteración en la O-GlcNacilación de Sp1 y que estas modificaciones post traduccionales pueden alterar su unión a la zona promotora de la FQ y modificar su expresión se evaluó por la técnica de inmunoprecipitación de cromatina, la unión de Sp1 al promotor de la FQ

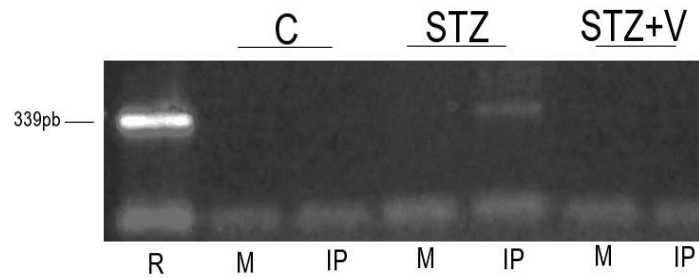


Figura 7 Inmunoprecipitación de cromatina del promotor de la FQ La flecha indica el fragmento amplificado. R: control positivo; M mock; IP inmunoprecipitado

En este ensayo se observó que en el grupo STZ hubo un aumento en la cantidad de Sp1 unido al promotor de la FQ que disminuyó por la administración de vanadato (Fig. 7). Estos resultados se correlacionan con los niveles de ARNm de la enzima encontrados en ambos grupos experimentales, sugiriendo que el efecto observado sobre la expresión de la FQ, podría estar mediado por cambios en los niveles de glicosilación de Sp1.

Estos resultados sugieren que en este modelo la expresión de la FQ en el hígado de los animales diabéticos está regulada por los niveles nucleares de Sp1 glicosilados que a su vez pueden ser modulados por el tratamiento con vanadato.

3.4. Bibliografía

- ✓ Cánepa E., Llambías E. & Grinstein M. (1984) Effect of glucose on the induction of delta-aminolevulinic acid synthase and ferrochelatase in isolated rat hepatocytes by allylisopropylacetamide. *Biochim. Biophys. Acta.* **804(1)**: 8-15.
- ✓ Cánepa E., Galvagno M., Llambías E., Passeron S. & Grinstein M. (1985) Studies on regulatory mechanisms of heme biosynthesis in hepatocytes from experimental-diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta.* **847(2)**: 191-197.
- ✓ Cánepa E., Pereda M., Llambías E. & Grinstein M. (1992) Regulation of phenobarbital-induced ferrochelatase mRNA activity by dibutyryl cAMP and glucose in normal and diabetic rat hepatocytes. *Biochem. Cell. Biol.* **70(1)**: 26-33.
- ✓ Crooks D., Ghosh M., Haller R., Tong W. & Rouault T. (2010) Posttranslational stability of the heme biosynthetic enzyme ferrochelatase is dependent on iron availability and intact iron-sulfur cluster assembly machinery. *Blood.* **115(4)**: 860-869.
- ✓ Di Pierro E., Cappellini M., Mazzucchelli R., Moriondo V., Mologni D. *et al.* (2005) A point mutation affecting an Sp1 binding site in the promoter of the ferrochelatase gene impairs gene transcription and causes erythropoietic protoporphyria. *Exp. Hematol.* **33(5)**: 584-591.
- ✓ Hart G., Slawson C., Ramirez-Correa G. & Lagerlof O. (2011) Cross talk between O-GlcNacylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu. Rev. Biochem.* **80**: 825-858.
- ✓ Magness S., Tugores A. & Brenner D. (2000) Analysis of ferrochelatase expression during hematopoietic development of embryonic stem cells. *Blood.* **95(11)**: 3568-3577.
- ✓ Majumdar G., Harrington A., Hungerford J., Martinez-Hernandez A., Gerling I. *et al.* (2006) Insulin dynamically regulates calmodulin gene expression by sequential O-glycosylation and phosphorylation of Sp1 and its subcellular compartmentalization in liver cells. *J. Biol. Chem.* **281(6)**: 3642-3650.

- ✓ Marshall S. & Okuyama R. (2004) Differential effects of vanadate on UDP-N-acetylglucosaminyl transferase activity derived from cytosol and nucleosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318(4)**: 911-915.
- ✓ Silva M., de Brito Magalhães C., de Paula Oliveira R., Silva M. & Pedrosa M. (2012) Differential expression of iron metabolism proteins in diabetic and diabetic iron-supplemented rat liver. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **26(3)**: 123-129.
- ✓ Taketani S., Mohri T., Hioki K., Tokunaga R. & Kohno H. (1999) Structure and transcriptional regulation of the mouse ferrochelatase gene. *Gene.* **227(2)**: 117-124.
- ✓ Tan N. & Khachigian L. (2009) Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **29(10)**: 2483-2488.
- ✓ Tephly T., Hasegawa E. & Baron J. (1971) Effect of drugs on heme synthesis in the liver. *Metabolism.* **20(2)**: 200-214.
- ✓ Wilkinson N. & Pantopoulos K. (2014) The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Front. Pharmacol.* **5(176)**: 1-15.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En primer lugar, los resultados obtenidos en la presente Tesis demuestran que el modelo murino de diabetes *mellitus* tipo 1 generado por la administración de STZ resultó adecuado para el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a la relación existente entre el metabolismo de los hidratos de carbono y el metabolismo del hemo sugerido por el llamado “efecto glucosa”.

En este modelo, el vanadato fue efectivo como agente insulino-mimético, ya que contrarrestó el estado diabético inducido por el STZ disminuyendo significativamente los valores de glucemia y llevando la glucosuria a niveles del orden de los encontrados en los controles. Esta acción del vanadato resultó útil para discernir entre los efectos causados por el estado diabético en general y aquellos atribuibles directamente a la insulina.

Conjuntamente con la instauración de la diabetes se observó una inducción del ALA-S1 hepática, enzima reguladora de la biosíntesis del hemo, así como un aumento significativo de los contenidos urinario de ALA y PBG. Estos hallazgos son claros indicadores de una desregulación de la vía biosintética del hemo y el metabolismo de los hidratos de carbono constituyendo una fuerte evidencia de la interrelación entre ambas vías.

Nuestros resultados demuestran la participación directa de la insulina en la regulación de la biosíntesis del hemo, por cuanto la inducción del ALA-S1 hepática, tanto a nivel del ARNm como de su proteína, se revirtió cuando los animales diabéticos fueron tratados con insulina exógena o vanadato. Estudios previos realizados en cultivos de hepatocitos ya habían establecido una relación entre la insulina y la expresión del ALAS-1, sin embargo la presente Tesis constituye la primera demostración *in vivo* de dicha relación.

El efecto del vanadato sobre los niveles de expresión del ARNm del ALA-S1 estaría mediado por cambios en la concentración de dos factores de transcripción: FOXO y NRF-1.

El estado diabético también incrementó el ARNm de la FQ sin alterar los niveles de su proteína, mientras que el vanadato revirtió dicho efecto. Estos

resultados sugieren la existencia de un punto adicional de control del metabolismo de los hidratos de carbono sobre el metabolismo del hemo a nivel transcripcional y post traduccional de esta enzima. Dicho control, estaría mediado por la unión de Sp1 al promotor de la FQ, debido a una mayor O-Glicosilación de este factor de transcripción y por los niveles de hierro respectivamente.

Los resultados obtenidos en esta Tesis no solo representan, como ya se ha mencionado, la primera demostración *in vivo* de la relación entre los niveles de insulina y la biosíntesis del hemo a través de la regulación de la expresión de la enzima reguladora de dicha vía, el ALAS-1 sino que abren la posibilidad de explorar el potencial terapéutico de los agentes insulino-miméticos, como el vanadato, en el tratamiento de los ataques agudos de porfiria.

Dra. Alcira Batlle

Dra. Esther Gerez

Lic. Leda Oliveri