

Informe final de investigación

Título del proyecto: Expresión del Receptor 1 de Transferrina y Ferroportina en placenta humana a término, de acuerdo con el estado nutricional del hierro materno.

¹Grupo de Investigación en Alimentación y Nutrición Humana, Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia.

²Grupo de Reproducción, Facultad de Medicina-Universidad de Antioquia.

³Grupo Biología CES-EIA, Universidad CES.

⁴E.S.E. Hospital General de Medellín.

⁵Clínica el Prado, Medellín.

⁶Grupo Centauro, Escuela de Medicina Veterinaria-Universidad de Antioquia.

Financiación: estrategia de sostenibilidad (Fondos Comité para el Desarrollo de la Investigación, CODI, 2013-2014, Universidad de Antioquia) otorgada al Grupo de Investigación Alimentación y Nutrición Humana; Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia; Fundación Banco de la República; Laboratorios LAPROFF S.A.

Contenido

1. Resultados científicos directos.

1.1 Estudio de corte transversal sobre la asociación entre el estado de hierro materno, la expresión del Receptor 1 de Transferrina y Ferroportina, en placenta humana a término y el estado de hierro del neonato.

1.2 Estudio de la expresión del Receptor 1 de Transferrina y Ferroportina en el modelo de células BeWo de coriocarcinoma, bajo condiciones de supresión del hierro en el medio de cultivo.

2. Resultados científicos indirectos

2.1 Formación de recurso humano para la investigación.

2.2 Fortalecimiento de la capacidad de investigación.

2.3 Contribución a la socialización de la investigación.

3. Manuscritos y publicaciones

4. Participación en congresos

5. Premios y distinciones

Anexos

1. Resultados científicos directos.

1.1 Estudio de corte transversal sobre la asociación entre el estado de hierro materno, la expresión del Receptor 1 de Transferrina y Ferroportina en placenta humana a término y el estado de hierro del neonato.

Resumen manuscrito

Los trabajos de investigación previos de la Línea Materno-Infantil del grupo Alimentación y Nutrición Humana, han permitido definir que existen deficiencias en el estado nutricional de hierro y folato en mujeres gestantes de la ciudad de Medellín y de otros municipios del departamento de Antioquia. Así mismo, ante la evidencia de la problemática de anemia ferropénica, por su alta prevalencia en la mujer gestante de países en desarrollo y sus efectos deletéreos en la salud y el bienestar materno-neonatal, y por la carencia de estudios que indiquen el papel que cumplen el Receptor 1 de transferrina (TfR1) y la Ferroportina (Fpn) en el transporte de hierro placentario, nos planteamos como pregunta de investigación si existía asociación entre el estado de hierro materno y del recién nacido, con la expresión de estas proteínas, en placenta humana a término.

Bajo la hipótesis que ante una deficiencia de hierro en la gestante, aumenta la expresión del TfR1 y Fpn para controlar la deficiencia de hierro neonatal, el objetivo general del proyecto consistió en establecer si había asociación entre el estado nutricional del hierro materno y neonatal, con la expresión de estas proteínas en trofoblasto de placenta humana a término.

Para el efecto, se diseñó un estudio de corte transversal, en el que un grupo de mujeres adultas (19-40 años) en las últimas semanas de gestación (35-37), se sometió a los exámenes clínicos y a la evaluación nutricional pertinente, para verificar el cumplimiento de los criterios de inclusión en el estudio. A las pacientes

se les informó sobre las condiciones y los objetivos del estudio y una vez firmaron el consentimiento informado, se les tomó una muestra de sangre con el fin de cuantificar diferentes indicadores bioquímicos relacionados con el metabolismo y el estado de hierro materno, para proceder a conformar tres grupos de pacientes, con base en las concentraciones de hemoglobina y ferritina sérica así: un grupo de pacientes con anemia y ferropenia, otro grupo con ferropenia sin anemia y un grupo control (Sin anemia y sin ferropenia) . Posteriormente, las pacientes fueron sometidas a cesárea electiva entre las semanas 37 y 39 de gestación; se tomó una muestra de sangre de la vena umbilical para determinar el estado de hierro del neonato y se recogió la placenta para aislar las vellosidades placentarias y a partir de estas, obtener células trofoblásticas.

Los biomarcadores del estado de hierro materno se estudiaron para establecer asociaciones con el estado de hierro neonatal y con la expresión de TfR1 y Fpn en trofoblastos y vellosidad placentaria. La expresión de estos receptores se evaluó mediante inmunohistoquímica en la vellosidad y mediante citometría de flujo en las células trofoblásticas positivas para un marcador específico del trofoblasto. Adicionalmente, se diseñó un plan de análisis para definir la estadística descriptiva de todas las variables y las posibles asociaciones entre variables maternas, entre aquellas de la madre y del feto y de cada una de ellas con los valores de expresión de TfR1 y Fpn.

Los resultados del estudio demostraron que 70.8% de las pacientes estaban vinculadas al régimen de salud subsidiado y 29.2%, al régimen contributivo. El 96% de las pacientes había ingerido suplemento de hierro durante la gestación, entre las cuales 92%, lo hacía de manera frecuente. La duración del consumo de suplemento mostró tendencia ($P = 0.113$) a ser menor en el grupo de gestantes con anemia-ferropenia (3,6 meses), comparado con el grupo de gestantes con ferropenia sin anemia (5,2 meses) y el grupo control (7,1 meses). Además, la duración de la ingesta del suplemento durante la gestación, correlacionó en forma

significativa, con la concentración de ferritina sérica materna ($P= 0,026$) (Manuscrito). En los neonatos, 22% presentó deficiencia de hierro pero no hubo diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Tampoco se encontró asociación entre la ferritina neonatal y los biomarcadores del estado de hierro materno.

La expresión del TfR1 predominó en la membrana apical del sincitiotrofoblasto y en células del citotrofoblasto, mientras que la expresión de la Fpn predominó en espacios intercelulares entre el citotrofoblasto y las células mesenquimatosas del estroma veloso, sin diferencias estadísticas significativas entre los grupos de gestantes. No se halló correlación entre los parámetros bioquímicos de las gestantes y la expresión de estas proteínas sin embargo, si hubo correlación positiva y significativa entre la ferritina neonatal con la expresión de Fpn ($P= 0,038$) y además la expresión del TfR1 correlacionó positivamente, con la expresión de Fpn ($P < 0.05$) (Manuscrito).

Los resultados de este trabajo sustentan la prescripción de la suplementación de hierro durante la gestación y establecen relaciones entre los parámetros bioquímicos indicadores del estado de hierro materno. Además, por primera vez se demuestra la expresión de TfR1 y Fpn en células trofoblásticas primarias y velosidades de placenta humana a término, en pacientes con diferencias en el estado nutricional del hierro. Los resultados de este estudio serán enviados a publicación al Journal of Clinical Nutrition.

1.2 Estudio de la expresión del Receptor 1 de Transferrina y Ferroportina en el modelo de células BeWo de coriocarcinoma bajo condiciones de supresión del hierro en el medio de cultivo.

Resumen manuscrito

La línea celular de coriocarcinoma BeWo, es aceptada universalmente como modelo de estudio del sincitiotrofoblasto de placenta humana a término. En estas células se ha descrito la expresión de receptores para el transporte de hierro, TfR1 y Fpn. Los diversos estudios han puesto en evidencia que la expresión del TfR1 es mucho más abundante en la membrana apical de las células cuando crecen en monocapas confluentes o en sistemas de cultivo tipo Transwell, mientras que la expresión de Fpn se ubica en la membrana basolateral. Esta separación de ambos receptores en compartimentos específicos de la célula, ha permitido plantear que el TfR1 capta el hierro del medio extracelular y lo transfiere a la Fpn para que esta lo transporte hacia la circulación fetal, como se ha demostrado en ratas gestantes.

La necesidad de evaluar si las condiciones de hierro del medio de cultivo podrían alterar la expresión de TfR1 y Fpn en las células BeWo, nos permitió diseñar un estudio en el que se disminuyó la concentración de hierro en el medio de cultivo, usando desferroxamina (DFO), para luego del tiempo de cultivo evaluar la traducción del mensaje (mRNA) para ambos receptores por técnica de PCR en tiempo real, y la expresión de la proteína en membrana por medio de citometría de flujo. Como controles se usaron células en cultivo a las cuales no se les adicionó (DFO). El objetivo fue evaluar si la expresión del TfR1 y de la Fpn por las células BeWo presentaba variaciones ante la supresión de hierro en el medio de cultivo, para ser usado como modelo de estudio de la regulación del transporte de hierro materno-fetal.

Los resultados del trabajo indicaron que no hubo diferencias estadísticas significativas en la expresión de receptores entre las células BeWo sometidas a un medio con supresión del hierro, con el uso de DFO, comparada con las células del grupo control. Sin embargo, cuando los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) para el TfR1 y para la Fpn ($p=0,635$ y $p=0,841$, respectivamente), fueron sometidos a un algoritmo de sustracción de Overton – procedimiento que permite evaluar variaciones sutiles en la expresión de receptores de membrana mediante citometría de flujo—, se observó que la expresión de ambas proteínas sí fue significativamente mayor en las células desprovistas de hierro en el medio, en comparación con el control (Manuscrito).

Si bien no se hallaron diferencias estadísticas significativas en la expresión del mRNA para TfR1 y Fpn, los hallazgos sobre la variación en la IMF de estas proteínas, sugieren que la supresión de hierro en el medio de cultivo induce variaciones sutiles en la expresión de receptores en la célula.

Los resultados de este estudio serán enviados a publicación a la Revista Biomédica.

2. Resultados científicos indirectos.

2.1 Formación de recurso humano para la investigación.

El trabajo permitió la formación de una estudiante de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, énfasis bioquímica nutricional, y un estudiante de pregrado en Nutrición y Dietética a saber:

- A. Vanessa Corrales Agudelo. Profesional Nutricionista y Dietista, obtuvo su grado de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, área nutrición, en el mes de agosto de 2013.
- B. Julián Herrera Mejía, estudiante de Nutrición y Dietética de la Universidad de Antioquia, estuvo vinculado al proyecto en calidad de joven investigador.

2.2 Fortalecimiento de la capacidad de investigación.

En la ejecución del presente trabajo se logró realizar una interrelación básico-clínica que permitió reunir a profesionales, especialistas y científicos de la nutrición, la biología celular y molecular, la fisiología y bioquímica, la inmunología de la reproducción y la obstetricia y ginecología, como se puede evidenciar en la lista de investigadores e instituciones participantes del proyecto. Esto implicó la utilización de los espacios hospitalarios para la captación, inclusión en el estudio y toma de muestras de las pacientes; la utilización de laboratorios clínico, de nutrición y especializados para la cuantificación de todo el perfil bioquímico que permitió definir el estado de hierro materno y neonatal; la utilización de la infraestructura de laboratorios específicos en la Sede de Investigación Universitaria (en la Universidad de Antioquia) y laboratorios de biotecnología de la Universidad CES, para el procesamiento de las muestras, mediante PCR en tiempo real, inmunohistoquímica y citometría de flujo.

Lo anterior se constituyó en una de las fortalezas del proyecto de investigación, porque permitió realizar un trabajo interdisciplinario, optimizar la utilización de los recursos existentes sin recurrir a la compra de equipos que implicarían un sobre costo importante para el proyecto, además de permitir la cooperación con entidades del sector privado y público

2.3 Contribución a la socialización de la investigación.

Los resultados del proyecto se presentaron en tres congresos internacionales (Véase participación en congresos); en el contexto local, se presentaron en las reuniones académicas de los grupos de investigación participantes en el proyecto y se hará la presentación al grupo de especialistas de ginecología y obstetricia y pediatría de las instituciones de salud participantes.

3. Manuscritos y publicaciones.

- Parra-Sosa BE Corrales-Agudelo LV, Maldonado-Estrada JG, López-Rojas LE, Escobar-Aguilera LF, Bueno-Sánchez JC, Cardona-Ospina A. Asociación entre el estado nutricional de hierro materno, la expresión de Receptor 1 de Transferrina y Ferroportina en placenta a término y el estado de hierro neonatal. **Manuscrito en preparación para enviar a Journal of Clinical Nutrition.**
- Corrales-Agudelo LV, Parra-Sosa BE, López-Rojas LE, Bueno-Sánchez JC, Maldonado-Estrada JG. La supresión de hierro en el medio de cultivo afecta la expresión del Receptor 1 de Transferrina y Ferroportina en células de coriocarcinoma BeWo. **Manuscrito en preparación para enviar a la Revista Biomédica.**
- Corrales Agudelo LV, Parra Sosa BE, Maldonado-Estrada JG, Burgos Herrera LC. Moléculas que participan en el transporte materno-fetal de hierro: importancia del receptor 1 de transferrina y de la ferroportina en la

placenta humana. **Editorial Académica Española**. 2012; 57p. ISBN: 978-3-659-05574-4.

- Corrales Agudelo LV, Parra Sosa BE, Maldonado-Estrada JG, Burgos Herrera LC. Moléculas que participan en el transporte materno-fetal de hierro: importancia del receptor 1 de transferrina y de la ferroportina en la placenta humana. **Rev Iatreia** 2011; 24: 41-50.
- Parra Sosa BE, Corrales Agudelo LV, Maldonado Estrada JG, Bueno Sánchez JC, Cardona Ospina A, Escobar Aguilera LF y Correa A LJ. Expresión del receptor 1 de transferrina (TfR1) y de ferroportina (FPN) en células BeWo como un modelo de transporte de hierro materno-fetal. **Perspectivas en Nutrición Humana. Separata-Memorias Nutrial** 2013; marzo. Pag 125.

4. Participación en congresos

Los resultados del proyecto de investigación se presentaron en los siguientes congresos:

- 2do Congreso Internacional de Nutrición Pediátrica. Universidad de la Sabana. Presentación oral (Bogotá D.C. octubre 3-5/2013).
- Evento Nutrial. 6° Coloquio Internacional y 7° Nacional de Investigación en Alimentación y Nutrición Humana. Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia. Presentación oral (Medellín, marzo 6-9/2013).
- XVI Congreso Latinoamericano de Nutrición. Promoción de la salud y prevención de enfermedades. Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN). (Habana-Cuba 12-16 noviembre/2012). Presentación póster.

5. Premios y distinciones

- Certificado de cuarto puesto “Mejor Investigación Nacional”. 2do Congreso Internacional de Nutrición Pediátrica (Bogotá D.C. octubre 3-5/2013).

Anexos

Anexo 1. Manuscrito: Parra-Sosa BE, Corrales-Agudelo LV, López-Rojas LE, Escobar-Aguilera LF, Bueno-Sánchez JC, Cardona-Ospina A, Maldonado-Estrada JG. Asociación entre el estado nutricional de hierro materno, la expresión de receptor de transferrina y ferroportina en placenta a término y el estado de hierro neonatal. Manuscrito en preparación para enviar a Journal of Clinical Nutrition.

Anexo 2. Manuscrito: Corrales-Agudelo LV, Parra-Sosa BE, López-Rojas LE, Bueno-Sánchez JC, Maldonado-Estrada JG. La supresión de hierro en el medio de cultivo afecta la expresión del Receptor 1 de Transferrina y la Ferroportina en células de coriocarcinoma BeWo. Manuscrito en preparación para enviar a revista Biomédica.

Anexo 3. Libro. Corrales Agudelo LV, Parra Sosa BE, Maldonado-Estrada JG, Burgos Herrera LC. Moléculas que participan en el transporte materno-fetal de hierro: importancia del receptor 1 de transferrina y de la ferroportina en la placenta humana. Editorial Académica Española. 2012; 57p. ISBN: 978-3-659-05574-4.

Anexo 4. Artículo de revisión. Corrales Agudelo LV, Parra Sosa BE, Maldonado-Estrada JG, Burgos Herrera LC. Moléculas que participan en el transporte materno-fetal de hierro: importancia del receptor 1 de transferrina y de la ferroportina en la placenta humana. Rev Iatreia 2011; 24: 41-50.

Anexo 5. Resumen de investigación. Parra Sosa BE, Corrales Agudelo LV, Maldonado Estrada JG, Bueno Sánchez JC, Cardona Ospina A, Escobar Aguilera LF y Correa A LJ. Expresión del receptor 1 de transferrina (TfR1) y de ferroportina (FPN) en células BeWo como un modelo de transporte de hierro materno-fetal. Perspectivas en Nutrición Humana. Separata-Memorias Nutrial 2013; marzo. Pag 125.

Anexo 6. Certificado participación en 2do Congreso Internacional de Pediatría (Bogotá D.C. 2013).

Anexo 7. Certificado participación en Nutrial (Medellín 2013).

Anexo 8. Certificado participación en XVI Congreso Internacional de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (Habana-Cuba 2012).

Anexo 9. Premio Cuarto Puesto Nacional a la Investigación en Nutrición Pediátrica. 2do Congreso Internacional de Nutrición Pediátrica (2013).