



**FACULTADE DE CIENCIAS**

**GRAO EN BIOQUÍMICA**

**D.<sup>a</sup> Cecilia Ángel Reimúndez**

**ESTUDO DA REGULACIÓN DO  
METABOLISMO DO FERRO NO FÍGADO, EN  
RESPOSTA A UNHA DIETA A BASE DE  
PROTEÍNA DE ORIXE VEXETAL**

**Traballo Fin de Grao**

*Xuño 2024*

## Agradecementos:

Gustaríame agradecer a todas as persoas que me axudaron e apoiaron durante os meus anos de carreira e neste traballo de fin de grado:

En primeiro lugar, gustaríame expresar o meu agradecemento ao meu titor na UVigo, o Dr. Federico Mallo, pola confianza posta en min para darme a oportunidade de realizar o TFG no seu laboratorio e sobre todo por aportarme moitos coñecementos e consellos que me axudaron enormemente a finalizar de formarme como profesional. Ao Dr. Lucas C. González, grazas pola enorme paciencia que tivo connigo en tódolos momentos que acudía a el; por aportarme solucións e consellos que me resultaron de gran axuda para poder desenvolver correctamente este TFG. Aos meus compañeiros de laboratorio: Camila, Javier, Leticia, Pablo, Sara e Laura. Agradézovos os bos momentos compartidos xuntos e tódala axuda que me ofrecíades para poder realizar os procesos experimentais. Quero facer unha mención especial a miña compañeira Zainab Mastoor, da que aprendín todos os protocolos experimentais, grazas por tódolos coñecementos e por toda a axuda que me ofrecíades, eternamente agradecida polo gran esforzo que realizaches para poder axudarme neste período.

Agradecer tamén a miña titora académica da USC, Saskia C. Flament, por aceptarme como titoranda para este proxecto. Tamén aos demais profesores da carreira dos que tiven a oportunidade de aprender coñecementos e recursos esenciais para o meu futuro. En especial, a Ramiro Barcia, coordinador do grado que realizou un gran esforzo por todos os estudantes do grado en Bioquímica, e que no meu caso ofreceume moitos consellos para distintos trámites académicos.

A miña familia, por quererme e apoiarme ao longo de todo este período. Aos meus pais e avoa por darme a oportunidade de vivir esta etapa da miña vida. Ao meu irmán, pola confianza posta en min e a Yaiza por tódala súa axuda nestes 4 anos, grazas por crer en min.

As miñas amigas, darlle as grazas por estar ao meu lado nos momentos máis complicados da carreira, sobre todo en época de exames, por compartir experiencias e por votarme unha man sempre que me foi necesario.

A todos, moitas grazas.

## **Resumo en galego:**

A homeostase do ferro é fundamental para garantir unha concentración adecuada deste elemento para os procesos biolóxicos. Nos mamíferos, a biodispoñibilidade de ferro está regulada pola interacción da molécula hepcidina coa ferroportina, principal transportador de ferro na membrana celular. En condicións de eritropoiese mellorada, requírese máis ferro para proporcionar aos eritroblastos en desenvolvemento o ferro adecuado para a síntese do grupo prostético hemo da hemoglobina, polo tanto, aumenta a absorción do ferro da dieta e a mobilización dende as reservas mediante a diminución da expresión de hepcidina. A eritropoietina é outra molécula implicada no metabolismo do ferro segregada polo ril como a principal sinal que desencadea a eritropoiese en condicións anémicas e hipóxicas.

A hipótese e obxectivos deste estudo derivan da observación previa dun incremento de tódalas liñas celulares sanguíneas: vermella, branca e plaquetas, en ratas sometidas a unha dieta que contén só proteína de orixe vexetal de legume (lentella ou lupino).

Neste estudo analízanse as principais moléculas involucradas na regulación do metabolismo do ferro no fígado en ratas *Sprague-Dawley* trala administración de dúas dietas vexetais, cuxas modificacións poderían xustificar as melloras hematolóxicas observadas.

Realízase un deseño e validación dos cebadores para os xenes a estudo para optimizar a metodoloxía empregada, baseada na *PCR-real time*, coa que realizamos medicións da expresión dos niveis de ARNm.

Non se atoparon cambios nos niveis de ARNm das moléculas a estudo nos grupos a dieta con proteína só de orixe vexetal-legume, o que permite rexeitar a hipótese de partida. Polo tanto, os cambios previamente observados nos indicadores da liña sanguínea vermella non depende de cambios no metabolismo do ferro, e polo tanto, debemos estudar outros procesos metabólicos ou hormonais, que aínda están sen identificar.

**Palabras clave:** ferro, dieta, hepcidina, liñas celulares sanguíneas, *PCR-real time*.

**Título:** ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO DEL HIERRO EN EL HÍGADO, EN RESPUESTA A UNA DIETA A BASE DE PROTEÍNA DE ORIGEN VEGETAL.

**Resumo en castelá:**

La homeostasis del hierro es fundamental para garantizar una concentración adecuada de este elemento para los procesos biológicos. En los mamíferos, la biodisponibilidad de hierro está regulada por la interacción de la molécula hepcidina con la ferroportina, principal transportador del hierro en la membrana celular. En condiciones de eritropoyesis mejorada, se requiere más hierro para proporcionar a los eritroblastos en desarrollo el hierro adecuado para la síntesis del grupo prostético hemo de la hemoglobina, por lo tanto, aumenta la absorción del hierro de la dieta y la movilización desde las reservas mediante la disminución de la expresión de hepcidina. La eritropoyetina es otra molécula implicada en el metabolismo del hierro producida por el riñón como la principal señal que desencadena la eritropoyesis en condiciones anémicas e hipóxicas.

La hipótesis y objetivos de este estudio derivan de la observación previa de un incremento de todas las líneas celulares sanguíneas: roja, blanca y plaquetas, en ratas sometidas a una dieta que contiene solo proteína de origen vegetal de legumbre (lenteja o lupino).

En este estudio se analizan las principales moléculas involucradas en la regulación del metabolismo del hierro en el hígado en ratas *Sprague-Dawley* tras la administración de dos dietas vegetales, cuyas modificaciones podrían justificar las mejoras hematológicas observadas.

Se realiza un diseño y validación de los cebadores para los genes a estudiar para optimizar la metodología empleada, basada en la PCR-*real time*, con la que realizamos mediciones de la expresión de los niveles de ARNm.

No se encontraron cambios en los niveles de ARNm de las moléculas a estudio en los grupos a dieta con proteína solo de origen vegetal-legumbre, lo que permite rechazar la hipótesis de partida. Por lo tanto, los cambios previamente observados en los indicadores de la línea sanguínea roja no dependen de cambios en el metabolismo del hierro. Consecuentemente, debemos estudiar otros procesos metabólicos o hormonales, que aún están sin identificar.

**Palabras clave:** hierro, dieta, hepcidina, líneas celulares sanguíneas, PCR-*real time*.

**Titulo:** STUDY OF THE REGULATION OF IRON METABOLISM IN THE LIVER, IN RESPONSE TO A DIET BASED ON PLANT PROTEIN.

**Resumo en inglés:**

Iron homeostasis is essential to assure an adequate concentration of this element for biological processes. In mammals, iron bioavailability is regulated by the interaction of the molecule hepcidin with ferroportin, the main iron transporter in the cell membrane. Under conditions of enhanced erythropoiesis, more iron is required to provide developing erythroblasts with adequate iron for synthesis of the prosthetic heme group of hemoglobin, therefore increasing the absorption of iron from the diet and mobilization from stores by the decrease in hepcidin expression. Erythropoietin is another molecule involved in iron metabolism produced by the kidney as the main signal that triggers erythropoiesis in anemic and hypoxic conditions.

The hypothesis and objectives of this study derive from the previous observation of an increase in all blood cell lines: red, white and platelets, in rats subjected to a diet containing only protein of legume plant origin (lentil or lupine).

In this study, the main molecules involved in the regulation of iron metabolism in the liver in Sprague-Dawley rats are analyzed after the administration of two vegetable diets, whose modifications could justify the hematological improvements observed.

A design and validation of the primers for the genes to be studied is carried out to optimize the methodology used, based on real-time PCR, with which we measure the expression of mRNA levels.

No changes were found in the mRNA levels of the molecules under study in the groups with a diet with protein only of plant-legume origin, which allows us to reject the initial hypothesis. Therefore, previously observed changes in red blood line indicators do not depend on changes in iron metabolism. Consequently, we must study other metabolic or hormonal processes, which are still unidentified.

**Keywords:** iron, diet, hepcidin, blood cells lines, PCR-*real time*.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	7
I. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Regulación do ferro mediante diferentes hormonas .....	11
1.1.1. Hefcidina (HAMP).....	11
1.1.2. Eritroferrona (ERFE) e Eritropoietina (EPO) .....	13
1.2. Dietas baseadas en proteínas vexetais .....	14
II. HIPÓTESE E OBXECTIVOS.....	15
2.1. Hipótese.....	15
2.2. Obxectivos.....	16
III. MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
3.1. Animais de experimentación .....	16
3.2. Tratamento dietético .....	18
3.3. Reacción en cadea da polimerasa (PCR) a tempo real .....	19
3.4. Proceso Experimental.....	20
3.4.1. Extracción e análise do ARN con <i>kit</i> comercial.....	20
3.4.2. Cuantificación de ácidos nucleicos .....	21
3.4.3. Reversotranscripción.....	21
3.4.4. Deseño de <i>Primers</i> ou Cebadores .....	23
3.4.5. Optimización da PCR tempo real mediante validación dos cebadores dos xenes de estudo e dos xenes de normalización ( <i>Housekeepings</i> ) .....	24
3.4.6. Estudo das diferentes mostras cos diferentes cebadores dos xenes de estudos e cos <i>Housekeepings</i> .....	28
3.4.7 Análise estatístico e representación gráfica .....	28
IV. RESULTADOS .....	29
4.1. Estudo da Optimización dos diferentes <i>primers</i> para os xenes de estudo e para os <i>Housekeepings</i> nos diferentes tecidos para PCR.....	29
4.1.1. Resultados da validación individual de cada cebador co <i>Pool</i> de mostras .....	29
4.2. Análise dos niveis de expresión de ARN dos xenes vinculados ao metabolismo do ferro.....	39
V. DISCUSIÓN .....	42
5.1. Resultado da validación para os xenes de estudo e os xenes normalizadores ( <i>Housekeeping</i> ) para a optimización da PCR.....	42
5.2 Efecto do tratamento cunha dieta baseada en proteínas vexetais sobre dous grupos experimentais.....	44
VI. CONCLUSIÓN.....	47
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXOS.....	51

# ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>IL6:</b> interleucina 6
<b>ADNc</b> ácido desoxirribonucleico complementario	<b>JAK:</b> <i>Janus kinas</i>
<b>ARNm:</b> ácido ribonucleico mensaxeiro	<b>LE:</b> Lentella
<b>BBM:</b> do inglés, membrana do borde en cepillo	<b>LU:</b> lupino
<b>BLM:</b> do inglés, membrana basolateral	<b>MAPK:</b> fosforilasa quinasa activada por mitóxenos
<b>Tf:</b> transferrina	<b>NMR:</b> do inglés, resonancia magnética nuclear
<b>BMP:</b> do inglés, proteínas morfoxénicas óseas	<b>Pb:</b> pares de bases
<b>C.A.C.T.I:</b> Centro-Tecnolóxico á Investigación da Universidade de Vigo	<b>PCR:</b> do inglés, reacción en cadea da polimerasa
<b>Ct:</b> <i>cycle threshold</i>	<b>SAFEA404:</b> dieta A04 Mantemento, SAFE, PANLAB
<b>CTRP15:</b> <i>Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 15</i>	<b>SEM:</b> do inglés, desviación estándar da media
<b>EPO:</b> eritropoietina	<b>STAT:</b> <i>Signal Transducer and Activator of Transcription,</i>
<b>ERFE:</b> eritroferrona; tamén chamada mionectina	<b>Ta:</b> temperatura de <i>annealing</i>
<b>ERK:</b> sinais extracelulares	<b>TFG-β:</b> factor de crecemento transformante β
<b>FHC:</b> ferritina de cadea pesada	<b>TfR1:</b> receptor 1 de transferrina
<b>FLC:</b> ferritina de cadea lixeira	<b>TfR2:</b> receptor 2 de transferrina
<b>FNP1:</b> ferroportin	<b>Tm:</b> temperatura de <i>melting</i> /fusión
<b>GDF15:</b> <i>Growth Differentiation Factor 15</i>	<b>TWSG1:</b> <i>Twisted Gastrulations</i>
<b>HAMP:</b> hepcidina	<b>TWSG1:</b> <i>Twisted Gastrulations</i>
<b>HIF alpha:</b> Hypoxia Inducible Factor alpha	<b>UVigo:</b> Universidade de Vigo
<b>HFE:</b> do inglés, proteína de hemocromatose humana	<b>ΔG:</b> do inglés, enerxía libre de Gibbs
<b>Housekeeping:</b> do inglés, xene normalizador	
<b>HXV:</b> hemoxuvelina	

# I. INTRODUCCIÓN

O ferro (Fe) constitúe un oligoelemento esencial para numerosos organismos vivos, xa que é un compoñente fundamental dunha vasta cantidade de proteínas e enzimas esenciais para o desenvolvemento de numerosas funcións vitais, tales como a respiración, a proliferación celular e a transdución de sinais celulares. Do mesmo xeito, o ferro é un elemento limitante para a produción de eritrocitos e crítico nas funcións inmunolóxicas activadas por estímulos, debido á súa intervención en distintas vías efectoras da inmunidade mediadas por células e citocinas (Yeh et al., 2004).

O ferro na dieta pode estar presente baixo a forma de ferro hemo (ou orgánico) e ferro non hemo (ou inorgánico). Nunha dieta equilibrada está presente nunha proporción aproximada de 6-7 mg por cada 1000 calorías ingeridas. As principais fontes de ferro orgánico son a hemoglobina e a mioglobina, presentes nas proteínas de orixe animal. Este tipo de ferro caracterízase por unha elevada biodisponibilidade, sendo capaz de ser absorbido ata un 30%, e resultando pouco afectado por outros compoñentes da dieta. Por outra banda, a biodisponibilidade do ferro inorgánico está determinada polo equilibrio entre os inhibidores dietéticos, como os fitatos, tanatos e fosfatos, e os facilitadores, tales como os aminoácidos e o ácido ascórbico. O ferro inorgánico é obtido principalmente de alimentos de orixe vexetal e a súa absorción é máis limitada, sendo menor ao 5% (Alonso et al., 2017). A diferenza do ferro orgánico, a súa contribución nutricional é maior a pesar da súa pouca biodisponibilidade, xa que absorbesse de maneira máis eficiente e rápida. Esta é a razón pola que a absorción dietética do ferro é un proceso que precisa estar moi ben regulado.

Unha das características fundamentais do ferro, e que explica a súa gran utilidade biolóxica, é a súa capacidade para existir e interconvertirse en dous estados de oxidación: ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Barrios, M.F. 2016). Esta propiedade permite que o ferro actúe como un axente catalítico redox, aceptando e doando electróns. Porén, este mesmo atributo converte o ferro nun elemento potencialmente perigoso, xa que o exceso de ferro libre ou anómalo pode resultar tóxico debido á súa capacidade para reaccionar coas especies reactivas de osíxeno, producidas como consecuencia da respiración celular. Esta interacción pode provocar a oxidación de macromoléculas colindantes e a peroxidación de proteínas, do ADN e de lípidos de membrana.

Debido á baixa solubilidade do ferro en este estado, os organismos biolóxicos desenvolveron mecanismos internos para conservar e reciclar o ferro, co obxectivo de minimizar os posibles efectos tóxicos e maximizar os seus beneficios biolóxicos (Nemeth & Ganz, 2021). Consecuentemente, o 80% do ferro total no organismo atópase unido a proteínas, formando complexos como as hemoproteínas (hemoglobina, mioglobina e demais enzimas que conteñen hemo), mentres que o 20% restante distribúese entre compostos non-hemo, como a transferrina (ferro de transporte) e a ferritina máis a hemosiderina (ferro de reserva). O papel que o ferro desempeña no organismo varía en función da forma molecular na que se atopa.

O fígado desempeña un papel fundamental na homeostase do ferro, xa que é un dos lugares de almacenamento do ferro cando se atopa en exceso. No caso dun home adulto san, o fígado almacena entre o 12,5% e o 25% (0,5 a 1 g) do ferro corporal total (Zhang et al., 2004). Os hepatocitos son as células hepáticas encargadas do almacenamento do ferro, que principalmente se atopa na forma de ferritina. Esta é unha molécula soluble que está formada por 24 subunidades de cadeas pesadas e lixeiras que varían en proporción segundo o seu papel funcional: predominan as cadeas lixeiras nos tecidos con función principal de depósito e as pesadas nos tecidos con maior utilización do Fe.

Os hepatocitos tamén desempeñan un papel importante na produción da molécula hepcidina (HAMP) que realiza unha función crucial na homeostase do ferro. Ademais, os hepatocitos son unha fonte de transferrina (Tf), que é a molécula que transporta o ferro na sangue por excelencia (Barrios, M.F. 2016).

O maior compartimento onde se atopa almacenado o ferro son os eritrocitos. Estes conteñen de 2 a 3 gramos de ferro, pero parte do ferro está presente tamén nos macrófagos, xa que non pode estar libre nos tecidos debido aos seus efectos tóxicos. Estes últimos destrúen os eritrocitos senescentes; o ferro que se libera almacenase como ferritina citosólica ou hemosiderina. Ademais, parte deste ferro é exportado para unirse a proteínas circulantes, como a transferrina, para ser transportado ata os precursores eritroides e formar novos eritrocitos.

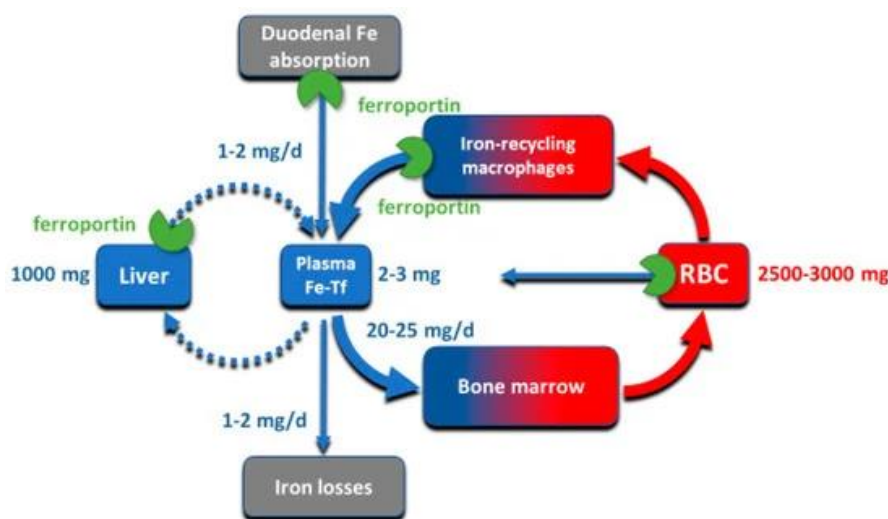


Figura 1: Fluxos e compartimentos clave do metabolismo do ferro (Nemeth & Ganz, 2021)

Para comprender a clave da homeostase do ferro é fundamental ter en conta que a perda sistémica de ferro non se modula durante situacións de deficiencia ou sobrecarga. A concentración estable de ferro circulante mantense a través da absorción, o almacenamento e a reciclaxe do ferro procedente da dieta. Desde este punto de vista, a maioría dos organismos vivos posúen mecanismos para modular a adquisición de ferro e manter a súa homeostase, grazas a mecanismos reguladores que se atopan perfectamente compenetrados para controlar a absorción e a excreción.

Estes mecanismos axudan a garantir un subministro de ferro adecuado para todos os procesos metabólicos que o necesitan. Ata o momento, non se descubriu a existencia de ningún mecanismo regulatorio específico da excreción, polo que a absorción é o proceso crítico que debe ser equilibrado coa mobilización das reservas e as perdas diarias, mediante a regulación intestinal. Os dous mecanismos fundamentais implicados neste equilibrio realízanse a nivel intracelular, en función da cantidade de ferro dispoñible para a célula, e a nivel sistémico onde a molécula hepcidina ten un papel crucial (Aozani & Nunes, 2015).

A maior parte do Fe almacenado pode ser exportado mediante proteínas transportadoras na circulación (por exemplo a transferrina) para poder crear un proceso dinámico que facilite o intercambio entre os lugares de absorción, reciclaxe e almacenamento.

A transferrina-ferro é absorbida cando se liga ao receptor 1 de transferrina (TfR1), o cal é internalizado en endosomas que son acidificados para permitir a disociación do ferro do complexo TfR1-Tf e o posterior transporte deste a través da membrana endosómica cara o citoplasma. O receptor TfR1 exprésase en todas as células, e a súa concentración máis alta atópase nos precursores eritroides (Coffey & Ganz, 2018).

A absorción e distribución tisular do ferro está principalmente controlada pola interacción da molécula hepática hepcidina co receptor de Fe, ferroportina (FNP1). Esta última é o único exportador celular coñecido do ferro e tamén o podemos atopar cos seguintes nomes: Ireg1 ("*Iron-Regulated Transporter 1*") e MTP1 ("*Metal Transporter Protein*") (Zhang et al., 2004). A súa expresión predomina nos enterocitos duodenais, nas células de Kupffer e nos macrófagos. A ferroportina localízase na membrana basolateral dos enterocitos intestinais e no compartimento citoplasmático das células do sistema retículo endotelial (SER), onde presenta unha distribución predominantemente basolateral, aínda que tamén se pode atopar no citoplasma basal e apical destas células.

A expresión da molécula hepcidina está regulada en función do nivel de ferro presente no organismo. Nunha situación de sobrecarga de ferro, aumenta a súa expresión, é dicir, sintetízase hepcidina en cantidades significativas provocando a supresión da absorción intestinal. A hepcidina diríxese ao intestino delgado para interactuar co receptor FNP1. A unión é unha conformación aberta cara fora. Esta provoca a obstrución da vía de saída do ferro causando a súa internalización e posterior degradación. Deste xeito, o ferro queda no interior dos enterocitos duodenais unido á hepcidina. O cambio conformacional na proteína inicia o proceso de ubiquitinización e liberación do ferro que é eliminado do organismo a través da excreción cos enterocitos senescentes. Esta regulación da FNP1 pola hepcidina a través deste mecanismo endocítico é semellante á endocitose de receptor inducida por un ligando xenérico.

Nun estado de hipoxia, eritropoiese ou déficit de ferro, o proceso é o contrario; a expresión de hepcidina regulase negativamente por diversas sinais.

## 1.1. Regulación do ferro mediante diferentes hormonas

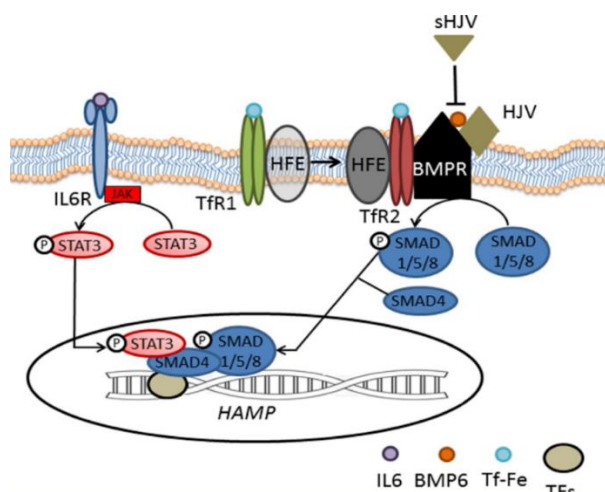
### 1.1.1 Hecpidina (HAMP)

A hepcidina é unha molécula que se sintetiza predominantemente nos hepatocitos, pero pode ter algunha expresión noutros tecidos e células: neutrófilos, monocitos, linfocitos, adipocitos e cerebro (Aozani, K., & Nunes, M., 2015).

A síntese desta molécula mediada por ferro desencadéase a partir da vía das proteínas morfoxénicas óseas BMP/SMAD. Dentro desta vía o BMP6 é un ligando das BMP cun papel titular que pertence a familia do factor de crecemento transformante  $\beta$  (TFG- $\beta$ ). A transcripción da HAMP activase por medio da sinalización desta vía cando se presenta un aumento de Fe no organismo. Actualmente, existen evidencias que indican que o receptor de transferrina 2 (TfR2) e a proteína de hemocromatose humana (HFE) son as responsables da detección de ferro extracelular ligado a transferrina. O TfR2 controla a saturación da Tf, xa que compite co TfR1 pola ligazón a HFE. Polo tanto, cando o complexo TfR2/HFE se activa interactúa coa hemoxuelina (HXV), o correceptor de BMP específico de ferro. Consecuentemente, obtense como resultado un aumento da concentración sérica de ferro e unha elevada saturación de Tf, xa que potencia a vía de BMP (Ginzburg, Y. Z. 2019). Como consecuencia impulsase a expresión de HAMP a través da vía de sinalización de quinasas, reguladas por sinais extracelulares/fosforilasa quinasa activada por mitóxenos (ERK/MAPK) e desencadéase a vía de sinalización intracelular. (Varga et al., 2021).

Outra forma de regular a hepcidina é mediante a vía de sinalización JAK2 (*Janus kinase*)/STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) que actúa en estados de inflamación activándose principalmente pola citocina IL-6 que, como toda citocina, únese á superficie do seu receptor iniciando así a fosforilación e translocación de STAT3 ao núcleo onde se produce unha regulación positiva da transcripción da hepcidina.

As vías mediadas por BMP/SMAD e Tf2R/HFE están sendo estudadas pola súa contribución na regulación por inflamación pero aínda non se coñecen os mecanismos precisos que ocorren (Varga et al., 2021).

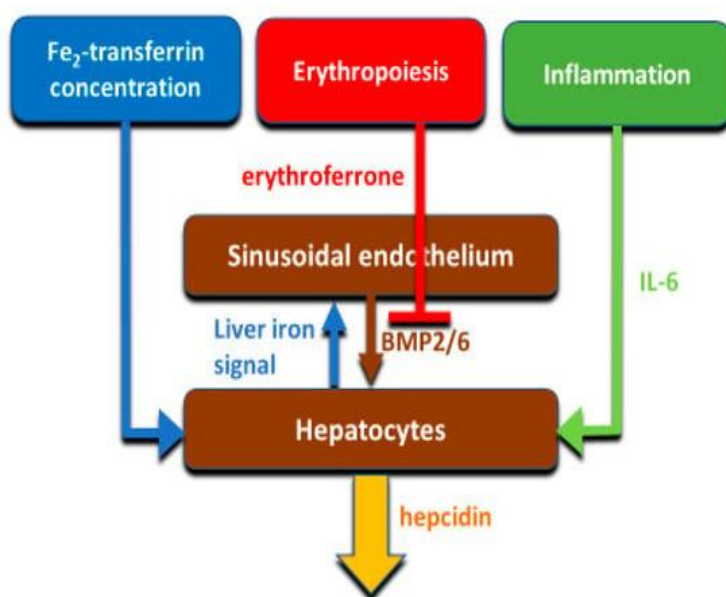


**Figura 2: Esquema das distintas vías de sinalización que coordinan a regulación da hepcidina.** As proteínas morfoxénicas BMP6 e posiblemente BMP2 únense ao BMPR provocando unha cascada de sinalización que causa a fosforilación de SMAD 1/5/8 o que dará lugar ao complexo SMAD4 que se translocará ao núcleo para iniciar a transcripción de HAMP. Por outro lado, cando se produce a cascada inflamatoria, a IL-6 únese ao receptor IL6R activando a vía de sinalización JAK/STAT que desencadea a fosforilación de STAT3, o que facilita a súa translocación ao núcleo. Esta atópase coa SMAD 1/5/8 e iniciase a expresión de HAMP (Ginzburg, Y. Z., 2019).

Investigacións recentes en modelos *in vivo* mostraron que a hepcidina é regulada negativamente pola eritropoiese, a anemia e a hipoxia. Este proceso prodúcese porque é necesario o abastecemento de Fe para a produción de eritrocitos. A eritropoietina (EPO) -molécula liberada polas células medulares de ril cando o nivel de osíxeno é baixo en sangue - é a principal sinal que desencadea a eritropoiese en condicións anémicas e hipóxicas. Polo tanto, é razoable a existencia dunha participación directa da EPO na regulación da hepcidina (Pinto et al., 2008).

Aínda que a eritropoietina ten un papel importante, non é o único factor involucrado na regulación do metabolismo do ferro. Por esta razón, un gran número de grupos de investigación dedicáronse á procura e identificación doutra proteína, o factor eritroide, para explicar esta función. Diversas proteínas foron propostas como candidatas: *Growth Differentiation Factor 15* (GDF15), *Twisted Gastrulations* (TWSG1), Hemoxuvelin, e HIF-*alpha* soluble (Nucifora, E., 2017)(Coffey & Ganz, 2018). Os investigadores Tomas Ganz e colaboradores identificaron a eritroferrona (ERFE). Anteriormente era coñecida como mionectina por ser identificada no músculo, ou *Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 15* (CTRP15), aínda que tamén recibe o nome de Fam132a trala súa identificación como miocina derivada do músculo tralo exercicio (Qi et al., 2022).

ERFE é producida polos eritroblastos con intensa actividade eritropoética e reduce á síntese de HAMP converténdose nun factor crítico para a regulación do metabolismo do Fe. Os axentes eritropoéticos estimulan a actividade eritroidea, o que conduce a unha produción de ERFE que a súa vez facilita a absorción de Fe para a eritropoiese. Así mesmo, está demostrado que a ERFE é producida pola actividade eritroblástica incluso nos casos nos que a eritropoiese é ineficaz.



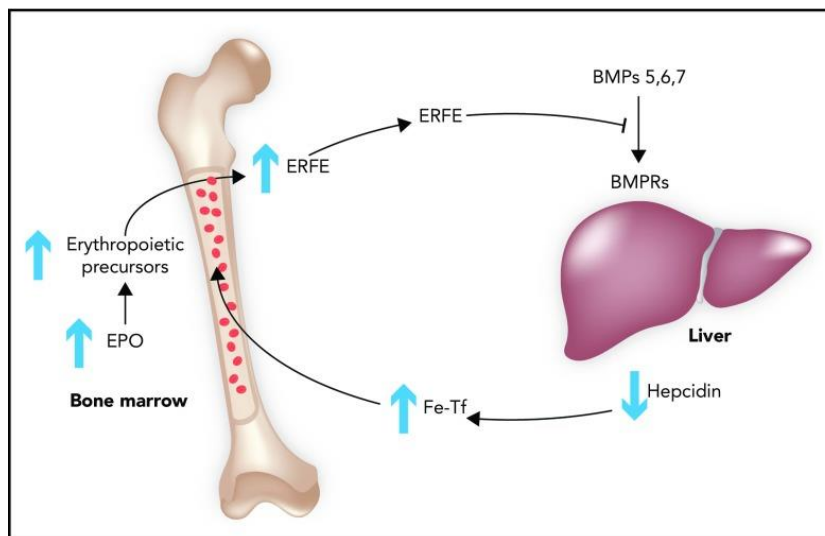
**Figura 3. Esquema da regulación positiva e negativa da hepcidina.** A transcrición da hepcidina está regulada polo ferro, a eritropoiese e a inflamación a través dos seus efectos sobre os hepatocitos. Isto débese a modulación da sinalización paracrina entre o endotelio sinusoidal hepático e os hepatocitos. A interacción entre estes factores inflúe na expresión xénica da hepcidina, asegurando unha resposta coordinada ante as demandas fisiolóxicas e o mantemento do equilibrio do ferro no organismo (Nemeth & Ganz, 2021).

### 1.1.2. Eritroferrona (ERFE) e Eritropoietina (EPO):

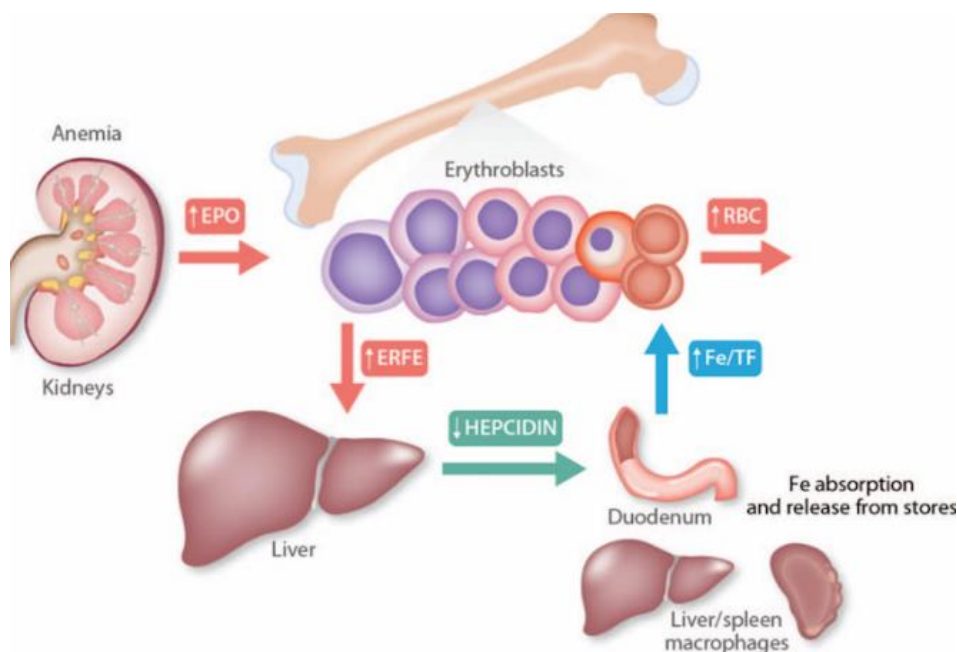
Por un lado, a EPO suprime a sinalización mediada polas BMP. A súa vez, investigacións recentes demostraron que a eritroferrona (ERFE) intervén na unión dun conxunto específico de proteínas morfoxénicas óseas (BMP) cos seus receptores (Corrales-Agudelo et al., 2017). Esta achega é fundamental para comprender como se reduce a expresión de hepcidina. A súa vez, o aumento da expresión de EPO conduce a unha expansión dos precursores eritroides, os cales segregan ERFE. Consecuentemente, as BMP 5,6 e 7 non se poden unir aos seus receptores porque estes atópanse bloqueados, polo tanto, este feito desencadea unha diminución na sinalización destas moléculas. A acción conxunta destes factores permite que os niveis de transferrina unida ao ferro aumenten en sangue, promovendo a absorción de Fe por parte dos precursores eritropoéticos, e potencia a regulación negativa da HAMP.

A pesar de que a unión directa de ERFE aos receptores de BMP aínda non se demostrou, realizáronse estudos utilizando anticorpos monoclonais bloqueadores contra ERFE para comprobar a capacidade desta proteína para reducir a expresión de hepcidina, pero non se conseguiu atopar a conexión entre o ERFE e o bloqueo das BMP (Zhao et al., 2020).

Por outro lado, atopouse que ERFE forma parte da familia de proteínas relacionadas co factor de necrose tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Recentes estudos determinaron que o receptor de insulina é un potencial receptor para CTRP15 (ERFE) (Zhao et al., 2020). As evidencias indican que esta molécula únese a un receptor da membrana na superficie dos hepatocitos para antagonizar a expresión de hepcidina pero non existen evidencias dun receptor coñecido (Qi et al., 2022).



**Figura 4. Esquema modelo da inhibición da produción de hepcidina mediada por BMP6.** O aumento da expresión de eritropoietina (EPO) induce a expansión dos precursores eritroides, os cales segregan eritroferrona (ERFE) que bloquea a unión das proteínas morfoxénicas óseas (BMP) 5, 6 e 7 aos seus receptores BMP. Este bloqueio conduce a unha diminución da sinalización de BMP no fígado, o que resulta nunha redución da produción de hepcidina. Esta a súa vez, exerce control inhibitorio sobre a liberación de ferro no sangue ao regular negativamente a ferroportina. Ao mesmo tempo esta acción aumenta a transferrina (Tf) unida ao ferro, o que promove a absorción de ferro polos precursores eritropoéticos para satisfacer os requirimentos para a síntese de hemoglobina (Zhang & Enns, 2018).



**Figura 5. Esquema xeral do efecto das moléculas reguladoras do metabolismo do ferro.** En resposta á anemia prodúcese un incremento na produción de eritropoietina (EPO) por parte do ril que estimula aos eritroblastos para que aumenten a produción de eritroferrona (ERFE). A ERFE circulante actúa directamente sobre os hepatocitos, suprimindo a produción de hepcidina (HAMP) e consecuentemente provoca a redución desta molécula no plasma. Estes niveis baixos de HAMP permiten a liberación do ferro almacenado, principalmente en macrófagos e hepatocitos. Ao mesmo tempo aumenta a absorción do ferro da dieta o que resulta nunha maior carga de ferro na transferrina (Coffey & Ganz, 2018).

## 1.2. Dietas baseadas en proteínas vexetais

As dietas baseadas en proteínas vexetais teñen menor abundancia de certos aminoácidos esenciais como poden ser a metionina e a lisina. Ademais, estas dietas poden carecer doutros nutrientes esenciais, que son aportados en maior cantidade por alimentos de orixe animal, como son os ácidos graxos poliinsaturados omega-3 de cadea larga e a cobalamina (vitamina B12). Cabe destacar tamén que as proteínas vexetais non conteñen colesterol e teñen unha proporción menor de graxas saturadas en comparación coas proteínas de orixe vexetal. Notoriamente, estas dietas teñen unha cantidade relativamente maior de fibra dietética en comparación con dietas convencionais. (Khor et al., 2021).

Ao mesmo tempo, as dietas vexetais asóciense con deficiencias nutricionais, especialmente déficits de vitamina B12, vitamina D, zinc, iodo ou ferro. (Selinger et al., 2022). Estudos transversais demostraron que o nivel de ferro vese altamente afectado pola ausencia de ferro hemo e polo efecto de certos compoñentes presentes nos vexetais (Haider et al., 2017). Isto non indica unha prevalencia da deficiencia de ferro e anemia, pero si supón un maior perigo en situacións de estrés ou perda de sangue. Para satisfacer as necesidades do Fe nestas dietas é indispensable incluír diariamente proteínas de legumes e outros vexetais que melloren a absorción do Fe non hemo, como son por exemplo os cítricos ricos en vitamina C. É importante recalcar que os legumes e cereais son ricos en fitatos, moléculas que poden inhibir a absorción do ferro non hemo, polo que, é esencial aplicar distintos métodos culinarios sobre estes

alimentos para minimizar o seu contido (Soto-Aguilar et al., 2021). Estes fitatos poden ser parcialmente destruídos polas enzimas presentes nas lévedos.

As lectinas tamén xogan un papel importante posto que reducen significativamente a absorción de minerais importantes como o zinc e o ferro igual que fan os fitatos. Estas lectinas poden adherirse ao epitelio intestinal e provocar crecementos coliformes nas paredes intestinais ou ben poden unirse ás enzimas dixestivas. Estas lectinas atópanse sobre todo nas legumes e na soia (Cuadrado-De Juan, M. 2021).

## II. HIPÓTESE E OBXECTIVOS

### 2.1 Hipótese

O grupo de investigación do Laboratorio de Endocrinoloxía da UVigo leva uns anos traballando nun proxecto europeo denominado ALEHOOP, o cal consiste no estudo do efecto de distintas dietas, baseadas en proteínas vexetais, sobre a produción de proteínas e os seus posibles efectos fisiolóxicos nun modelo animal.

Realizouse un experimentos previo en ratas *Sprague-Dawley* con 3 dietas diferentes: dieta estándar e dúas dietas vexetais, durante un período de 28 días. Ao finalizar o experimento recolléronse mostras sanguíneas e realizouse un estudo hematolóxico no que se observou un aumento en todas as células sanguíneas. Tanto no grupo lentella como no grupo lupino atopouse un aumento do número total das células vermellas, da hemoglobina total, do hematocrito e das plaquetas. Especificamente no grupo lentella a serie branca ten un importante incremento nas súas células.

Estes antecedente indicannos que as tres series de células sanguíneas están incrementadas e suxire cambios no desenvolvemento das células sanguíneas destes animais que solo se pode atribuír ao cambio de fonte de proteína.

Un dos elementos limitante para a produción das células da serie vermella, e en menor grao da serie branca e as plaquetas, é a biodisponibilidade e incorporación de ferro. En consecuencia, estes cambios deberían verse reflectidos en modificacións da expresión nas moléculas involucradas no metabolismo do ferro no fígado, como principal órgano regulador do metabolismo férrico.

## 2.2. Obxectivos

1. Optimizar e deseñar os *primers* para a técnica de *real-time* PCR para estudar a expresión das principais proteínas implicadas no metabolismo e manexo do ferro polo fígado como son: ferroportina, transferrina, ferritina de cadea lixeira (FLC), ferritina de cadea pesada (FHC), hepcidina, mionectina (eritroferrona), eritropoietina e interleucina 6 xunto cos seus xenes normalizadores (*Housekeepings*).
2. Estudar os cambios de expresión de ARNm das proteínas arriba mencionadas derivados da modificación na fonte principal de proteína pola inxesta de dietas baseadas en proteínas de orixe vexetal.

## III. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais de experimentación

Os animais empregados neste experimento son ratas macho de nove semanas de idade (250-275 g) da cepa *Sprague-Dawley* procedentes de JANVIER LABS SAS (Francia), criadas no Servizo de Bioexperimentación do Centro de Investigación Biomédicas (CINBIO) da Universidade de Vigo. Esta raza orixínouse no ano 1925 polo físico-químico Rober S.Dawley e foi o resultado do cruce de ratas Wistar con outra cepa descoñecida (Giráldez Dávila, 2008).

Todos os procedementos experimentais e protocolos de manipulación de animais foron levados a cabo baixo a supervisión e aprobación do Comité Ético de Experimentación Animal é órgano habilitado da Universidade de Vigo sendo responsable final o Dr. Lucas Carmelo González Matías, co código de procedemento da Xunta de Galicia ES360570215601/22/FUN01/FIS02/LCGG/01, aprobado polo xefe do servizo provincial de gandería do departamento territorial da Consellería do Medio Rural e do Mar da provincia de Pontevedra. Cumprindo a Directiva Europea 2010/63/UE e as leis e políticas españolas (Real Decreto 53/2013) do benestar animal (ES360570215601/22/FUN01/FIS02/LCGG/01, Xunta de Galicia).

Todos os traballos con animais foron realizados por persoal de laboratorio acreditado coa capacitación para desenvolver as distintas funcións do traballo con animais de experimentación.

O experimento tivo unha duración de 28 días seguidos repartidos entre os meses de febreiro e marzo, polo tanto, o tempo final foi de 33 días, xa que os animais tiveron uns días de adaptación previos. Así mesmo, unha vez chegaron os animais ao centro permaneceron estabulados no animalario da universidade durante un período de corentena (1 semana) en racks ventilados - este é un paso obrigatorio -. Durante todo o proceso, realizáronse nos individuos un seguimento da evolución do seu peso corporal e do estado físico.

Os diferentes grupos de animais colocáronse - de maneira completamente aleatoria -, en gaiolas metabólicas individuais creando así unha diferenciación en tres grupos (Táboa 1). Estes animais permaneceron un período de 4 días de adaptación ás gaiolas metabólicas no que os animais do grupo control e os dos grupos experimentais recibiron unha mesma dieta (A04 Mantemento, SAFE, PANLAB, Barcelona, España, (SAFEA404)). Ao longo de todo o experimento os animais atopáronse baixo condicións controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), cun fotoperíodo de 12 horas de luz-12 horas de escuridade e unha humidade relativa do 50%. Así mesmo, a comida e a bebida se lles dispuxo *ad libitum*.

**Táboa 1. Clasificación dos tres grupos empregados no experimento xunto coa composición das dietas correspondentes.**

<b>Ratas <i>Sprague-Dawley</i></b>	<b>Nº individuos</b>	<b>Tipo de dieta</b>	<b>Composición dieta</b>
Grupo Control (CO)	8	Dieta estándar.	Dieta SAFE A04 16,1% proteínas: cebada, trigo, millo, soia e hidrolizado de proteínas de peixe.
Grupo extracto vexetal 1 (LU)	10	Dieta 1, dieta vexetal	Proteína vexetal baseada en extracto de lupino. Mestura do 80% de (SAFE U8978A01R 00243 AIN 0.5% de proteína) e 20% (de proteína vexetal baseada en extracto de lupino) para unha porcentaxe final da mestura do 16% de proteína.
Grupo extracto vexetal 2 (LE)	10	Dieta 2, dieta vexetal	Proteína vexetal baseada en extracto de lentella. Mestura do 78% de (SAFE U8978A01R 00243 AIN 0.5% de proteína) e 22% (de proteína vexetal baseada en extracto de lentella) para unha porcentaxe final da mestura do 16% de proteína.

No día 0 comeza o experimento e os animais do grupo control manténselles a mesma dieta que a subministrada durante os días de adaptación, porén os animais experimentais dividíronse en dous grupos, de maneira aleatoria en función da composición das dietas proporcionadas, ambas compartirían o feito de estar enriquecidas con dous extractos vexetais diferentes. No día 1

extraéronse mostras de sangue aos animais e realizáronse medicións de diferentes parámetros como son o peso corporal, (resonancia magnética nuclear NMR (% de graxa, % masa magra e % auga corporal), cuantificación da inxestión de auga/comida xunto un análise de sangue completo con bioquímica e hematimetría. Ademais, realizouse a recolección das excrecións diarias para os posteriores estudos.

No día 28, ao completar os experimentos, aos animais extraéronse mostras de sangue definitivas e posteriormente, púxose punto final aos animais mediante un método de eutanasia que se realizou dentro da normativa española RD53/2013 para o manexo de animais de experimentación, que consistiu na inhalación paulatina de dióxido de carbono.

Finalmente, os órganos e tecidos foron extirpados e lavados con solucións salinas e foron conservados de diferentes maneiras. No caso dos tecidos que empreguei no meu experimento, foron conservados a -80 °C para o seu posterior análises.

### **3.2 Tratamento dietético**

Os animais dos tres grupos foron alimentados coa dieta SAFEA04 (Scientific Diets ,Augy, Francia) *ad libitum* durante todo o período de corentena e de adaptación. Empregase esta dieta en forma de “pellets” para o mantemento dos roedores.

O grupo control mantivo esta dieta, pero administrada en polvo porque os animais dos grupos experimentais alimentáronse con dietas cunha composición vexetal tamén en polvo.

Nunha empresa coa que traballa o proxecto fixéronse extraccións destas proteínas a partir de subprodutos vexetais de leguminosas dos cales se obtiveron varios separados de proteínas. Nun primeiro lugar realizáronse análises proximais de todos os extractos en relación a humidade, proteínas, graxas, carbohidratos, minerais e actividade antioxidante. Atopouse que todos os extractos obtidos contiñan unha concentración de proteínas maior ao 80%, é dicir, son extractos moi puros en proteínas.

Os extractos elixidos para o proceso experimental, tras unha serie de análises do seu perfil estrutural, da dixestibilidade *in vitro* e da súa composición nutricional e antinutricional, foron o extracto Lentella (LE) e o extracto Lupino (LU). Comentar que estes extractos mezcláronse cunha dieta sen proteína proporcionada por SAFE U8978A01R 00243 AIN 0.5% de proteína. O extracto de Lupino constaría dunha mestura do 80% de (SAFE U8978A01R 00243 AIN 0.5% de proteína) e 20% (de proteína vexetal baseada en extracto de lupino) para unha porcentaxe final da mestura do 16% de proteína. Mentres que o extracto de Lentella sería unha mestura do 78% de (SAFE U8978A01R 00243 AIN 0.5% de proteína) e 22% (de proteína vexetal baseada en extracto de lentella) para unha porcentaxe final da mestura do 16% de proteína.

Estes extractos subministráronse durante os 28 días aos grupos LE e LU caracterízanse como dietas isoproteicas, cun 16% de proteína, e isocalóricas: dieta control 326.27 kcal/100g; dieta mestura con lupino 381.40 kcal/100g e dieta mestura con lentella 370.25 kcal/100g.

### 3.3 Reacción en cadea da polimerasa (PCR) a tempo real

A PCR en tempo real é unha técnica baseada na reacción en cadea da polimerasa e que empregamos para amplificar e cuantificar moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) ou moléculas de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), que é unha molécula de ADN de dobre cadea, na que unha das súas cadeas constitúe unha secuencia totalmente complementaria ao ADN mensaxeiro a partir do que se sintetiza. Deste xeito podemos acceder a datos fiables e precisos sobre a expresión xenética das células de estudo, xa que esta técnica combina a amplificación e a detección nun mesmo paso.

Este tipo de PCR a diferenza da PCR convencional permite a cuantificación dos produtos da amplificación. Esta detecta o aumento de fluorescencia durante a reacción que se relaciona directamente co número de copias que son amplificadas. Durante a reacción, pódese visualizar a cinética de cada unha en tempo real permitindo unha cuantificación sensible e específica (Valdez-Mijares & Hernández-Flores, 2018).

Para a realización desta precisase dun termociclador que nos permita realizar distintos ciclos de temperatura necesarios para a amplificación de diversas cadeas de ADN - a transición destas temperaturas debe ser rápida para permitir unha boa desnaturalización do ADN molde, o aliñamento dos oligonucleotidos e a síntese das novas cadeas -, neste caso empregamos o QuantStudio 6 que tiñamos a nosa disposición no Centro-Tecnolóxico á Investigación da Universidade de Vigo (C.A.C.T.I). Este leva integrado un espectrofotómetro que é un dispositivo óptico que permite realmente a análise, identificación e cuantificación das moléculas. Finalmente, precisase dun software para a captura e almacenamento das mostras; o *Software* empregado é QuantStudio 6 Pro Real-Time PCR System Software de Thermofisher.

Neste experimento empregamos un axente intercalante *SYBR green* para monitorear a síntese de ADN. Este é un tinte que se une ao ADN bicatenario pero non ao ADN monocatenario, por iso utilízase con frecuencia para controlar a síntese de ADN durante as reaccións de PCR en tempo real, xa que cando se une ao ADN bicatenario, emite unha fluorescencia moi intensa.

Para comprender a cuantificación das moléculas mediante a técnica PCR *real time* debemos ter en conta que a cantidade de ADN teoricamente duplícase con cada ciclo. Isto é o que mostra a cantidade de ADN despois de cada ciclo que debe ser o dobre do que era inicialmente, polo que despois de dous ciclos teremos  $2 \times 2$  veces máis de ADN e así consecutivamente de modo que ao finalizar  $n$  ciclos teremos  $2^n$  veces máis de ADN (Valasek & Repa, 2005).

A reacción non pode durar para sempre e eventualmente diminúe e alcanza unha fase de meseta, se usamos as cifras obtidas de maneira estándar non podemos detectar a amplificación nos ciclos anteriores porque os cambios non aparecen nesa escala, por iso é preciso realizar unha

escala logarítmica para poder observar os cambios nos ciclos anteriores á meseta. Neste contexto, precisase ter un limiar na parte lineal da reacción, e ademais este non debe estar situado máis arriba da metade da parte lineal, debe estar cerca da parte inferior da curva. Porén, este debe ser o suficientemente alto como para estar seguro de que as reaccións cruzan a liña debido á amplificación e non ao ruído que provoque o proceso.

En resumen, existe unha relación de liña recta entre a cantidade de ADN e o número de ciclos cando se mira nunha escala logarítmica porque a amplificación por PCR é unha reacción logarítmica na fase de crecemento exponencial.

Para o estudo das mostras precisase realizar unha serie de dilucións pois sábese que a medida que se dilúe a mostra necesítanse máis ciclos antes de que a amplificación sexa detectable. Isto débese a que a menor número de copias presentes inicialmente, maior é o número de ciclos necesarios para detectar fluorescencia.

### **3.4 Proceso Experimental:**

#### **3.4.1. Extracción e análise do ARN con *kit* comercial**

As mostras de fígado, músculo e ril das que dispoñemos se atopaban a  $-80^{\circ}\text{C}$  polo tanto, para realizar o proceso de extracción de ARN previamente precisamos seguir un protocolo de desconxelación. Este consistiu en colocar os órganos en xeo seco ata o momento de extracción do ARN. Unha vez comeza o proceso de extracción as mostras homoxeneizadas as colocamos en xeo seco. Finalmente, cando temos o ARN extraído volvemos a colocar as mostras a  $-80^{\circ}\text{C}$  e para posteriores procesos o ARN desconxelarémolo colocándoo en caixas de xeo.

O seguinte paso tras a desconxelación foi o de partir as mostras cun bisturí sobre unha placa de Petri estéril, conseguindo unha cantidade de mostras de 80-100 mg. . Posteriormente, engadimos 1 mL de TRI Reagent Solution (Invitrogen) para disgregar o tecido utilizando un homoxeneizador WITEG (Germany) para os tecidos de fígado e ril. No caso dos tecidos de músculo empregouse Mini Bead-Beater 24 (BioSpec) con bolas de sílice collendo 1 mL de Tri Reagent Solition. O homoxeneizado que se obtivo se incubou durante 5 minutos a temperatura ambiente e a continuación se levou a unha centrifuga Eppendorf 5415R que se puxo a 12.000 rpm durante 10 minutos mantendo unha temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Unha vez finalizado o proceso de centrifugación, recollemos o sobrenadante e o transferimos cunha pipeta a un microtubo novo para deixalo incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, engadimos en cada tubo 0,2 mL de cloroformo (Panreac, cat. N° 131252), axitamos enerxéticamente e volvemos a centrifugar a 12.000 rpm durante 15 minutos mantendo  $4^{\circ}\text{C}$  de temperatura. Esta vez recollemos a fase acuosa nun microtubo ao que lle colocaremos 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol (Sigma, cat. N° 19516), axitamos nun axitador tipo vórtex a mostra e incubamos a temperatura ambiente. Pasados 10 minutos centrifugamos de novo a 12.000 rpm, 8 minutos mantendo  $4^{\circ}\text{C}$ . Cunha pipeta aspiramos o sobrenadante para descartalo e lavamos o “pellet” con 1 mL de etanol 75%, deixando incubar estes tubos a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos para novamente volver a centrifugar a 7.600 rpm durante 5 minutos controlando a temperatura ( $4^{\circ}\text{C}$ - $25^{\circ}\text{C}$ ). Realizamos o proceso de aspiración do sobrenadante e o “pellet” o deixamos secando brevemente ao aire.

Finalmente, resuspendemos en auga libre de nucleasas, pero se antes de resuspender vemos que o “pellet” é moi sólido colocamos os tubos nunha incubadora a 25-30°C durante uns 2 minutos para asegurar unha boa dilución do ARN.

### 3.4.2. Cuantificación de ácidos nucleicos

A cuantificación a realizamos empregando un espectofotómetro de microvolumen NanoDrop. Este está deseñado para medir a concentración de ácidos nucleicos en mostras dun microlitro. O sistema de retención do sistema de NanoDrop Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) entrega tensión superficial para manter a mostra nun lugar entre dúas fibras.

Para o seu manexo podemos utilizar un volume de 0,5  $\mu\text{L}$  a 2  $\mu\text{L}$ .

Cando queremos comezar o análise das mostras o primeiro que necesitamos é medir un branco, para iso colocamos na cubeta auga libre de nucleasas e seleccionamos o botón “*Blank*”. Unha vez realizada esta medición, limpamos a cubeta e colocamos 1  $\mu\text{L}$  de mostra e seleccionamos a opción “*Measure*”. Rematada a medición limpamos a cubeta con auga libre de nucleasa e colocamos unha nova mostra.

Os resultados obtidos aparecen en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  pero o que precisamos é unha concentración de 2  $\mu\text{g}$  en 6  $\mu\text{L}$ . Sabemos que cargamos 1  $\mu\text{L}$  de mostra, entón realizamos unha regra de tres para saber que volume de auga libre de nucleasa precisamos para chegar ao 6  $\mu\text{L}$  e obter a concentración desexada.

Exemplo:

Un resultado de Nanodrop é 1,23  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e queremos calcular en canto volume temos 2  $\mu\text{g}$ , entón dividimos 2  $\mu\text{g}$  / 1,23 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) obtendo un valor de 1,63  $\mu\text{L}$ . Como o volume final que queremos é de  $\mu\text{L}$  restamos 6  $\mu\text{L}$  -1,63  $\mu\text{L}$  dándonos un volume de 4,37  $\mu\text{L}$  de auga libre de nucleasas. O resto de datos aparecen recollidos no Anexo 1.

### 3.4.3. Reversotranscripción

Para este proceso precisamos da enzima retrotranscriptasa para conseguir do ARN obtido previamente o ADNc. Para realizar este protocolo precisamos empregar o termociclador MyCycler™ Thermal Cycler System With Gradient Option (BIO-RAD), por iso o primeiro paso foi prender este aparato para que estivese preparado para cando o precisamos.

A continuación, empregaremos as dilucións de ARN de 2  $\mu\text{g}$  que temos conservadas a -20°C no frigorífico. Estas as colocamos en caixas de xeo, as axitamos cun vortex e as centrifugamos. Mentres, preparamos o “MIX 1”, para a primeira fase da reversotranscripción, calculando os volumes necesarios para o número de mostras que temos preparando unha mestura de compoñentes (Táboa 2).

**Táboa 2. Composición da mestura do MIX 1.**

<b>Compoñentes</b>	<b>Concentración stock</b>	<b>μL por mostra</b>	<b>Concentración final</b>
H2O DEPC		5.5	
<i>Random Primers</i>	100 μM	1,0	0,2 μg

Como precisamos un total de 6,5 μL e temos un total de 26 mostras multiplicamos as cantidades que precisamos polo número de mostras e mesturamos ambos compoñentes nun tubo eppendorf etiquetado para despois engadir a cada dilución de ARN de 6 μL os 6,5 μL de “MIX 1” obtendo un volume total de 12,5 μL.

Posteriormente, colocamos todos os tubos eppendorf no termociclador e seleccionamos o programa “Mix 1” o cal consiste en incubar 65 °C durante 5 minutos.

Entre tanto, preparamos o “MIX 2” (Táboa 3).

**Táboa 3. Composición da mestura do MIX 2.**

<b>Compoñentes</b>	<b>Concentración stock</b>	<b>μL por mostra</b>	<b>Concentración final</b>
<i>Buffer RT</i>	5x	4,0	1x
dNTPs	10 μM	2,0	1 μM
RiboLock	40 U/μL	0,5	1 U/μL
ReverseAIDRT	200 U/μL	1,0	10 U/μL

Calculamos o volume total de cada compoñente para 26 mostras e os xuntamos todos nun tubo eppendorf etiquetado. É importante que o último compoñente a engadir sexa a ReverseAIDRT e que todo o tempo que non se use este almacenada no frigorífico.

Unha vez finaliza o programa “Mix 1” collemos os tubos eppendorf deste e cunha pipeta lles engadimos 7,5 μL do MIX 2 de tal maneira que obtemos unha volume total en cada tubo eppendorf de 20 μL.

Finalmente, colocamos os tubos eppendorf de novo no termociclador e seleccionamos o programa “Mix 2” o cal consiste nos seguintes pasos:

- 10 minutos a 25 °C
- 60 minutos a 42 °C
- 10 minutos a 70 °C
- Incubación infinita a 4°C

Finalizado o programa, collemos os tubos eppendorfs e engadímolles a cada un 60 μL de auga libre de nucleasas, o volume total de cada mostra é de 80 μL. Estas mostras as almacenaremos en bolsas etiquetadas a -20 °C.

### 3.4.4. Deseño de *Primers* ou Cebadores

Estamos interesados en estudar diferentes moléculas que actúan no metabolismo do ferro. Para elo, precisamos duns cebadores que nos permitan amplificar determinadas secuencias dos xenes destas moléculas de interese.

O primeiro paso a seguir é a procura bibliográfica, en diferentes bases de datos e publicacións, destas moléculas para atopar esas secuencias de interese. Se xa hai publicacións que empregan cebadores concretos os debemos comprobar, en Primer-Blast (*Software* de uso público *National Library of Medicine*) e na páxina Oligoanalizertool.IDT (*Software* de *Integrated DNA Technologies*), comprobando que son aceptables, é dicir, que cumpran unha serie de premisas (Táboa 4). Así mesmo, debemos asegurarnos que eses cebadores son específicos da molécula que estamos buscando e que amplifiquen cos xenes de estudos nos tecidos analizados da cepa *Sprague-Dawley*; para iso precisamos empregar a ferramenta BLAST Nucleotide (*Software* de uso público da *National Library of Medicine*).

**Táboa 4. Requisitos que se deben de ter en conta para o deseño e síntese dos cebadores para a PCR-*real time* con *SYBR Green*.**

1. As últimas 3 pares de bases <b>non</b> deben ser exclusivamente GC.
2. Non debe haber posibilidade de hibridación ( <b>non</b> se deben formar homodimeros nin heterodimeros); nos fixamos na $\Delta G$ que é un cambio na enerxía libre dun sistema que transcorre dun estado inicial a un estado final.
3. Comprobar que existe unha unión de <i>primers</i> a secuencias de interese.
4. Temperatura de <i>melting</i> , tamén chamada temperatura de fusión do ADN. É a temperatura na que o 50% do ADN ten as dúas cadeas separadas: 55-60-65 °C
5. Lonxitude dos <i>primers</i> : 18-20-22 pares de bases (pb).
6. Porcentaxe de GC: 40-50-60%
7. A diferenza de temperatura de fusión entre cebadores non debe ser de máis de $\pm 1,5$ °C.
8. O tamaño do produto de amplificación debe estar entre 90 e 200 pares de bases (pb).

Se non atopamos as secuencias en ningunha publicación científica o que debemos realizar é unha procura da secuencia completa do xene da molécula de interese no GenBank (base de datos de uso público da *National Library of Medicine*). Unha vez nos aseguramos que ten expresión no fígado collemos a secuencia FASTA (formato de ficheiro informático baseado en texto) e a levamos a ferramenta Primer Blast. Colocamos todas as premisas correspondentes e solicitamos 10 pares de *primers*. Finalmente, escollemos o par de cebadores que mellor se adecúen as características que buscamos. A continuación realizamos unha verificación máis destes na páxina Oligoanalizertool.IDT. Finalmente, comprobamos que cobertura e porcentaxe de identidade teñen cada uns dos *primers* elixidos coa molécula de interese empregando a ferramenta BLAST Nucleotide. Se todos os parámetros están correctos solicitámoslos a IDT a través dunha casa comercial de produtos de laboratorio CeltaIngenieros (A Coruña)

Cando temos os cebadores no laboratorio débense centrifugar, sen previa apertura, a 10.000-14.000 rpm durante 10-15 segundos para precipitar o contido no fondo dos tubos. Posteriormente, engadimos, seguindo os protocolos de cada cebador, determinada cantidade de auga ultra pura (libre de ARNasas) comprada comercialmente, para así resuspender os cebadores e conseguir unha concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Seguidamente, realizamos alícuotas denominadas “Primer Mix”, as cales contiñan determinada parella de cebadores (*Forward* e *Reverse*), a unha concentración de 10  $\mu\text{M}$  para así evitar sucesivos ciclos de conxelación/desconxelación que puideran degradar as cadeas de ADN. Para conseguir estas alícuotas se colleron 10  $\mu\text{L}$  de *primer Forward* + 10  $\mu\text{L}$  de *primer Reverse* + 180  $\mu\text{L}$  de libre de nucleasas.

Todas as mostras de cebadores, tanto o *stock* de cebadores de 100  $\mu\text{M}$  como as alícuotas “Primer Mix” as gardamos a -20 °C perfectamente etiquetadas.

### 3.4.5. Optimización da PCR tempo real mediante validación dos Cebadores e dos Xenos de normalización (*Housekeepings*)

Para levar a cabo a posta a punto dos cebadores realizouse un *Pool* das mostras, é dicir, agrupáronse todas as mostras de ADNc, tanto as do grupo control como as dos grupos experimentais, de tal maneira que se colleu 6  $\mu\text{L}$  de cada individuo xuntando un volume total de 156  $\mu\text{L}$ . A partir deste conxunto de mostras de ADNc considerado como dilución 1x, realizáronse un total de 8 dilucións seriadas con factor de dilución 1/2x ata 1/256x collendo 80  $\mu\text{L}$  da dilución anterior e 80  $\mu\text{L}$  de auga libre de nucleasas.

Para realizar o análise por PCR empregamos SsoAdvance Universal SYBR Green SuperMix (BIO-RAD USA) que contén: anticorpos que se fusionan coa polimerasa, dNTPs,  $\text{MgCl}_2$ , potenciadores, estabilizadores e a molécula máis importante, o *SYBR Green*. Este únese o ADNc e emite fluorescencia, polo tanto, a través desta podemos cuantificar os ciclos de PCR.

No protocolo comercial recomendan o emprego de determinados volumes para obter unhas concentracións desexadas. No noso análise interézanos ter unha concentración final de cada cebador *Forward* e *Reverse* de 200-500 nM e 100 ng de ADNc. Por iso, mediante unha serie de cálculos determinamos, para un volume total de reacción de 10  $\mu\text{L}$ , cantos  $\mu\text{L}$  precisamos de alícuota “Mix” de cebadores e mostra, se empregamos os 5  $\mu\text{L}$  de *SYBR Green* ditados no protocolo que podemos ver no Anexo 2.

Cálculos:

- Na alícuota “Primer Mix” de cada cebador temos 10  $\mu\text{L}$  *Forward Primer* comercial 100  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{L}$  *Reverse Primer* comercial 100  $\mu\text{M}$  + 180  $\mu\text{L}$  auga libre de nucleasas = 200  $\mu\text{L}$ .

Se collemos 1  $\mu\text{L}$  deste “Primer Mix” seguindo a ecuación  $C_i$  (*Concentración Inicial*) x  $V_i$  (*Volume Inicial*) =  $C_f$  (*Concentración Final*) x  $V_f$  (*Volume Final*) de modo que a  $C_f$  = 0,5  $\mu\text{M}$  que é o mesmo que 500 nM de cada cebador.

- Por outra banda, temos 2  $\mu\text{g}$  de ARN e fixemos a retrotranscripción, polo tanto, temos 2  $\mu\text{g}$  ADNc en 80  $\mu\text{L}$ . Para facer o *Pool* collemos 6  $\mu\text{L}$  de cada mostra individual.

2  $\mu\text{g}$  – 80  $\mu\text{L}$

$x - 1 \mu\text{L}$                        $x = 0,025 \mu\text{g} \times 6 \mu\text{L} = 0,15 \mu\text{g}$

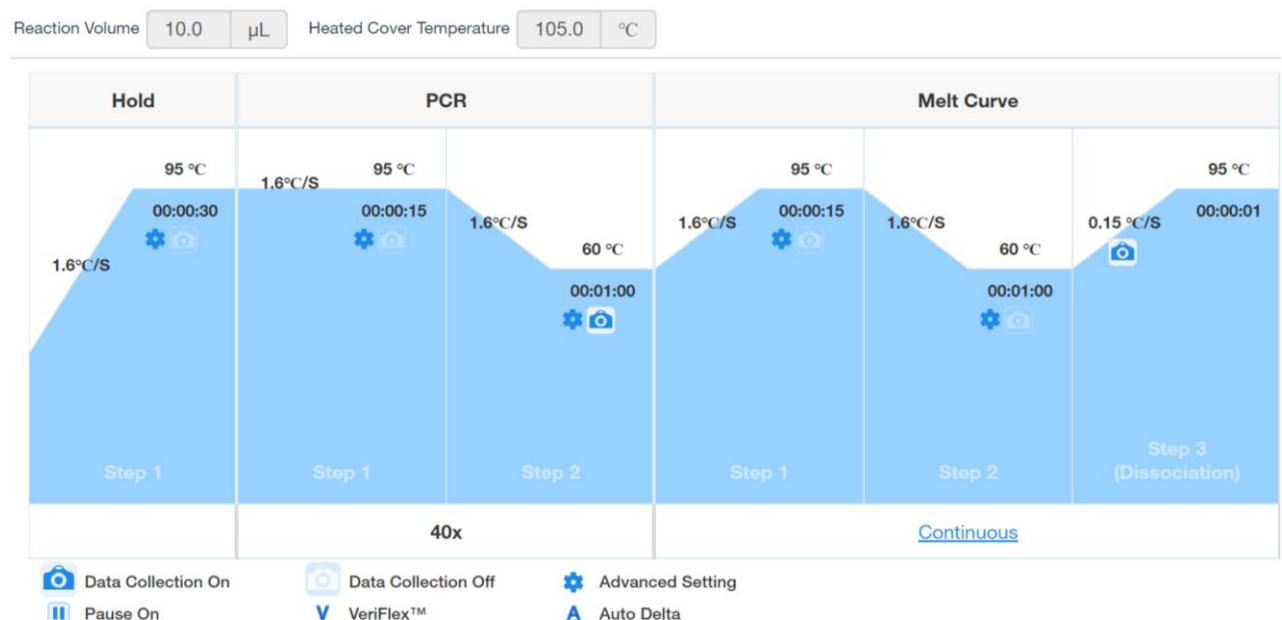
Como o total de mostras son 26, temos un total de 3,9  $\mu\text{g}$  en 156  $\mu\text{L}$ . Para a seguinte dilución (1/2) collemos 80  $\mu\text{L}$  do *Pool* e quedámonos con 76  $\mu\text{L}$ .

3,9  $\mu\text{g}$  – 156  $\mu\text{L}$

$x - 76 \mu\text{L}$                        $x = 1,9 \mu\text{g}$

Se collemos 4  $\mu\text{L}$  do *Pool* restante (dos 76  $\mu\text{L}$ ), entón teremos 0,1  $\mu\text{g}$ , é dicir, 100 ng de ADNc, porque sabemos que en 76  $\mu\text{L}$  temos 1,9  $\mu\text{g}$ .

Unha vez sabemos as cantidades de cada reactivo que precisamos para a reacción da PCR cargamos unha placa de 96 pocillos seguindo un esquema realizado previamente como o do exemplo do Anexo 3, cos seguintes volumes: 5  $\mu\text{L}$  de *SYBR Green*, 4  $\mu\text{L}$  de mostra e 1  $\mu\text{L}$  de alicuota “Primer Mix” de cebadores (consultar a composición na táboa 5 dos cebadores empregados). A placa sellada colócase no termociclador QuantStudio 6 no departamento de xenómica do C.A.C.T.I para realizar a PCR a tempo real empregando o programa previamente especificado (Figura 6).



**Figura 6.** Características do programa empregado nas PCR realizadas para a validación dos cebadores dos xenes de estudos e dos *Housekeeping* máis a análise das mostras.

**Táboa 5. Cebadores empregados\***

<b>Xene (Referencia NCBI)</b>	<b>Cebadores</b>	<b>Produto (pb)</b>	<b>Eficiencia (%)</b>	<b>Dilución ADNc de traballo</b>	<b>Xene normalizador (Housekeeping)</b>
HEPCIDINA (NM_053469.2)	<i>Forward: 5' - TTCCCATATGCC TCTTCTG - 3'</i> <i>Reverse: 5' - ACAAGGCTCTTGG CTCTCTATG-3'</i>	86	101,93	1/32	B-actina
FERROPORTINA (XM_063266613.1)	<i>Forward: 5' - CCTGACCTCAGCAAATTC- 3'</i> <i>Reverse: 5' - ACACTGCAAAGTGCCACATC-3'</i>	80	103,26	1/32	18S
TRANSFERRINA (D38380.1)	<i>Forward: 5' - GGCATCAGACTCC AGCATCA- 3'</i> <i>Reverse: 5' - GCAGGCCCATAGG GATGTT-3'</i>	101	104,33	1/16	18S
FERRITINA CADEA LIXEIRA (J02741.1)	<i>Forward: 5' - TAGGCAGCCTTTG TAACCGC- 3'</i> <i>Reverse: 5' - TCACTGTGGCTTC TCACAAAAC-3'</i>	85	100,14	1/16	B-actina
FERRITINA CADEA PESADA (NM_012848.2)	<i>Forward: 5' - AAGTGCGCCAGA ACTACCAC- 3'</i> <i>Reverse: 5' - CTTCAGGGCCACA TCATCCC-3'</i>	128	103,16	1/32	18S
IL-6 (M26744.1)	<i>Forward: 5' - CGCACTAAGGATC TGGCTAATG- 3'</i> <i>Reverse: 5' - CTACCCTGAGTTT CCAGTTGTC-3'</i>	92	-	-	-
ERITROPOIETINA (NM_017001.2)	<i>Forward: 5' - GCTGGGAGCTCAG AAGGAAT- 3'</i> <i>Reverse: 5' - CCCC GTGTACAGC TTCAGTT-3'</i>	142	98,43	1/16	B-actina
Mionectina/Eritroferrona/ CTRP15/Fam132a (NM_001377080.1)	<i>Forward: 5' - GCTGATCTGCATCCAGTCTCT- 3'</i> <i>Reverse: 5' - GGCATTGTCCAAGAAGACAGA-3'</i>	151	-	-	B-actina

\*Móstranse os xenes, secuencias de cebadores, tamaño do produto de amplificación, eficiencia da reacción, dilución de traballo e xene normalizador necesario para as PCR a tempo real dos tecido á estudo (fígado, ril e músculo).

Cos datos que obtemos do análise por PCR empregamos os *Cycle Threshold* (CT, que é o número de ciclo no que a sinal fluorescente cruza o limiar creando un incremento estatisticamente significativo respecto á sinal basal) para calcular a eficiencia da reacción representamos o logaritmo da concentración relativa do ADNc fronte o CT e obtemos unha ecuación da recta estándar. É importante mirar que a diferenzas entre os replicados non superen os 0,3 puntos e que o  $R^2$  sexa  $\geq 0,985$ .

Para observar a eficiencia fixémonos na pendente da recta, esta se é -3,3219 correspóndese a unha eficiencia do 100%. Isto é debido a que a eficiencia da PCR *real-time* calculase a partir das pendentes dadas nun Software LighCycler (Pfaffl, 2001). A correspondente eficiencia dun ciclo na fase exponencial calculase seguindo a ecuación , sendo o resultado do 100% de eficiencia de 2,00, xa que en teoría cada ciclo produce o dobre de ADN. Porén, considéranse válidos aqueles cebadores que presenten unha eficiencia entre o 90% e o 110%, é dicir, unha pendente entre -3,58 e -3,10.

Por outro lado, collemos o punto medio do rango dinámico, sendo a dilución máis grande a elixida, para determinar cal é a dilución de ADNc idónea de traballo nas diferentes mostras individualizadas.

A continuación, observamos as curvas de *melting* para comprobar que non existe contaminación e que a lonxitude do produto de amplificación ocorre nun mesmo rango de temperatura.

Unha vez calculada a eficiencia de cada par dos xenes de estudo e dos *Housekeeping*, xunto coa dilución de ADNc de traballo, comparáronse as rectas de amplificación dos xenes de estudo coas rectas dos *Housekeepings* para determinar que *Housekeeping* nos serve como xene normalizador. O *Housekeeping* empregado para cada cebador escolleuse en función á similitude da eficiencia de reacción entre o xene normalizador e o xene problema. Para estudala substituíronse nas ecuacións das rectas obtidas respectivamente do cebador e do *Housekeeping* o valor de x (das diferentes funcións das rectas) polo logaritmo da concentración relativa (de todas as dilucións feitas dende a concentración 1/2 ata a 1/256). Con estes Ct teóricos realizouse un diferencial, é dicir, restouse aos valores dos Ct teóricos calculados para cada dilución do xene de estudo – os valores dos Ct teóricos calculados para cada dilución para o xene normalizador. Obtemos uns novos valores teóricos da diferenza de Cts ou “DCt” que representamos fronte o logaritmo da concentración relativa conseguindo unha nova ecuación da recta que debe presentar unha pendente cun resultado de  $\pm 0,1$  ou menor para considerarse válido para o emprego comparativo de determinado xene de estudo co seu correspondente *Housekeeping*. Na táboa 5 móstranse os valores para cada un dos xenes de estudo e o seu respectivo *Housekeeping* para cada tecido.

### 3.4.6. Estudo das diferentes mostras cos diferentes Cebadores e *Housekeepings*

Para o estudo dos nosos xenes de interese realizamos de cada mostra individualizada 8 dilucións seriadas dende 1 ata 1/256 conservando cada grupo de dilucións en bolsas etiquetadas a -20°C.

A continuación, collemos unha placa de 96 pocillos, de fondo 0,2 mL, que cargamos con 4 µL de cada unha das mostras individualizadas por duplicado cunha dilución axeitada para cada cebador (Táboa 5). Ademais, engadíronse 1 µL de alicuota “Primer Mix” de cebadores e 5 µL de *SYBR Green*. A placa selouse e levouse a analizar ao departamento de xenómica no C.A.C.T.I., onde realizaron a PCR-*real time* co programa especificado (Figura 6).

Os resultados gardáronse nun Excel de tal maneira que temos os duplicados dos xenes de estudo e os duplicados dos xenes dos *Housekeepings* xunto cos seus CTs correspondentes. Facemos as medias de cada duplicado e realizamos unha diferenza das medias dos xenes de estudo menos as dos xenes do *Housekeepings* creando a columna (*Mean 1 – Mean 2*) como aparece representado no exemplo do Anexo 4.

A continuación, realizamos unha media total da columna (*Mean 1 – Mean 2*) para conseguir un único valor que denominaremos  $\Delta$ DiferenzaMedias e que empregaremos para crear unha nova columna, a  $\Delta\Delta C_T$  que calcularemos coa columna (*Mean 1 – Mean 2*) menos o valor da columna  $\Delta$ DiferenzaMedias para posteriormente empregar a función POTENCIA ( $2(-\Delta\Delta C_T)$ ) creando unha nova columna coa que conseguiremos unha serie de datos dos que realizaremos unha nova media.

Finalmente, empregaremos a ecuación: (valor POTENCIA ( $2(-\Delta\Delta C_T)$ ) \*100)/media dos valores POTENCIA ( $2(-\Delta\Delta C_T)$ ) do grupo control e realizaremos unha última media destes valores obtidos. No caso do grupo control esta última media sempre debe dar un valor de 100. Collemos o valor do control para relacionalo coas outras dietas porque deste xeito relacionamos o que é estándar cos nosos datos experimentais.

### 3.4.7 Análise estatístico e representación gráfica

Os datos obtidos en todos os experimentos analizáronse mediante o *Software* estatístico Microsoft Excel (Microsoft Office 2021) e/ou GraphPad 6 para Windows, así como os gráficos. Os resultados obtidos na validación dos cebadores e dos diferentes xenes estudados representáanse graficamente mediante o valor dos Cts das medicións fronte ao logaritmo da concentración das mostras. Determinamos a ecuación da recta e o valor de  $R^2$  para a validación dos cebadores e realizamos un estudo das curvas de *melting* (ou de fusión) representadas a través da derivada da fluorescencia fronte á temperatura (gráficos proporcionados polo *Software* QuantStudio 6 PRO Real Time PCR System (ThermoFisher Scientific).

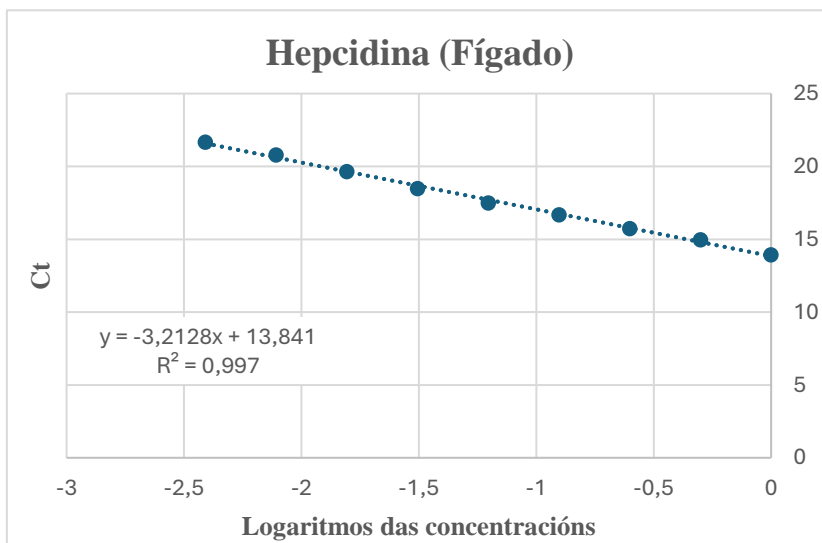
Os valores dos niveis de expresión de ARN dos xenes vinculados ao metabolismo do ferro, representáanse en gráficos de barras, onde o valor representado se corresponde coa media (M) e o error coa desviación estándar da media (SEM) (media  $\pm$  o error estándar da media (SEM)). O tamaño mostral das poboacións de cada experimento detallase nos pes de figura dos resultados e representáanse coa letra “n”.

No análise dos datos, determinamos se as mostras seguen unha distribución normal aplicando o test de normalidade Saphiro-Wilk. Ademais, determináronse os *outliers* mediante o método de desviación estándar; mídese a distancia dos datos con respecto á media ( $D_m$ ) e si  $D_m > n \cdot S$  ( $1 \leq n \leq 3$ ) se descartando porque estes son valores atípicos ou extremos dunha mostra estatística que poden afectar potencialmente á estimación dos parámetros da mesma. Posteriormente, estudamos as diferenzas estatísticas entre as medias dos grupos empregando o test estatístico de análise da varianza (ANOVA). Se os valores que obtemos desta presentan significación estatística procedemos a determinar as diferenzas entre o grupo control e os dous grupos experimentais aplicando o test PostHoc HSD de Tukey. Considérase como nivel de significación estatística as diferenzas con valores de  $p \leq 0,05$ .

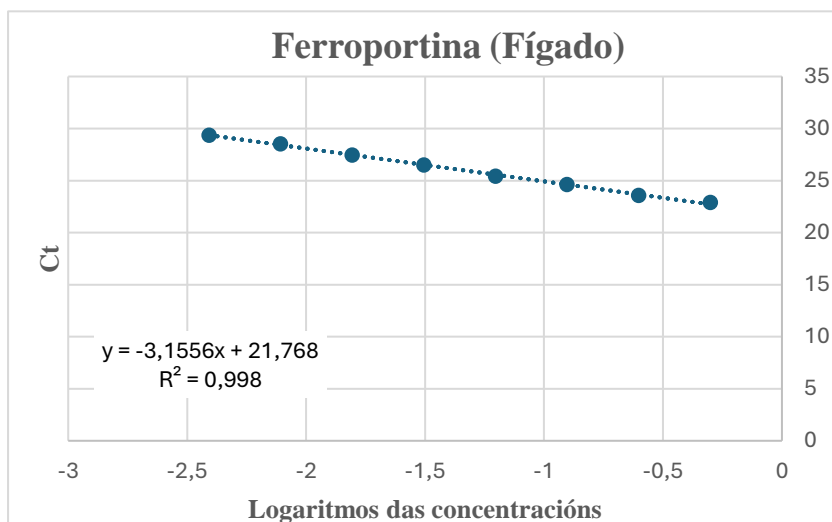
## IV. RESULTADOS

### 4.1 Estudo da Optimización dos diferentes *primers* para os xenes de estudo e para os *Housekeepings* nos diferentes tecidos para PCR.

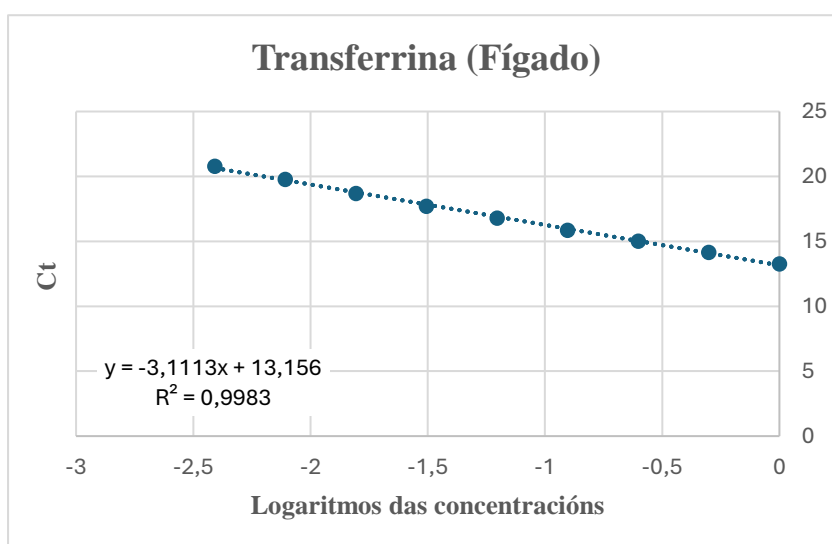
#### 4.1.1 Resultados da validación individual de cada cebador co *Pool* de mostras:



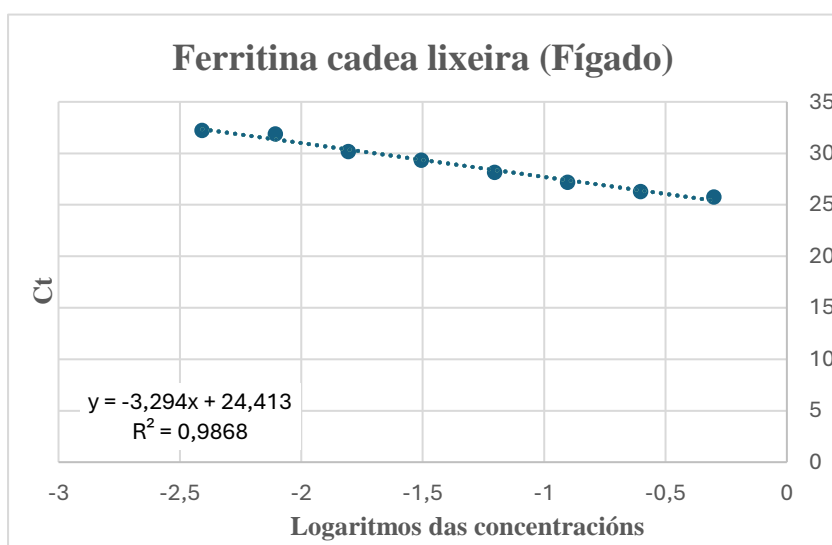
**Figura 7. Linearidade do ensaio dos cebadores de Hepcidina en mostra de fígado.** Representáanse os valores de Ct (media de dúas medicións) do cebador HAMP fronte os logaritmos das concentracións relativas das mostras de fígado.



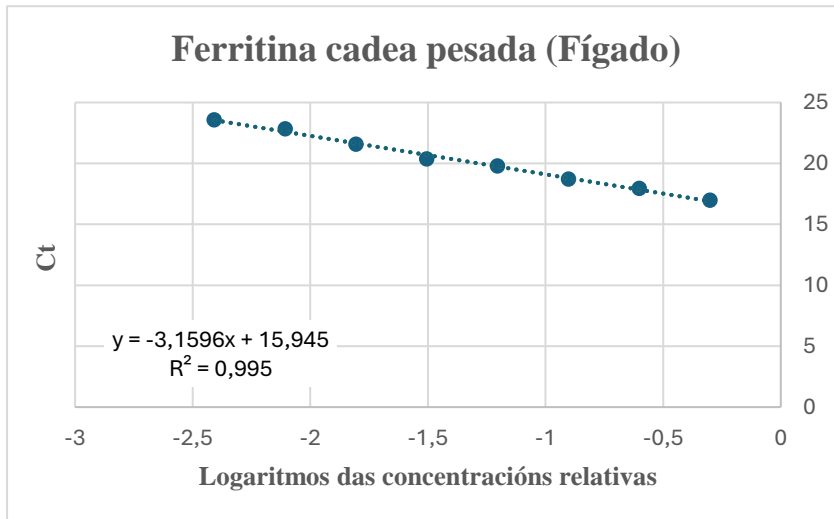
**Figura 8. Linearidade do ensaio dos cebadores de Ferroportina en mostra de fígado.** Representáanse os valores de Ct (media de dúas medicións) do cebador FERRO fronte os logaritmos das concentracións relativas das mostras de fígado.



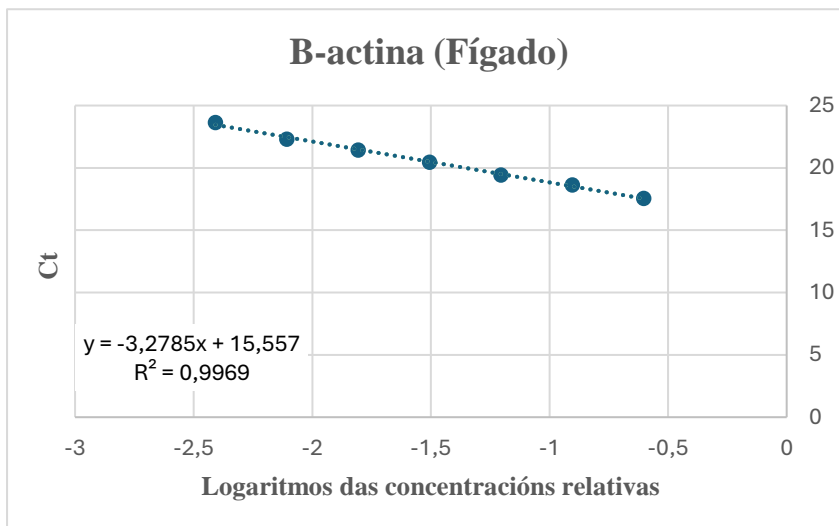
**Figura 9. Linearidade do ensaio dos cebadores de Transferrina en mostra de fígado.** Representáanse os valores de Ct (media de dúas medicións) do cebador TRANSF fronte os logaritmos das concentracións relativas das mostras de fígado.



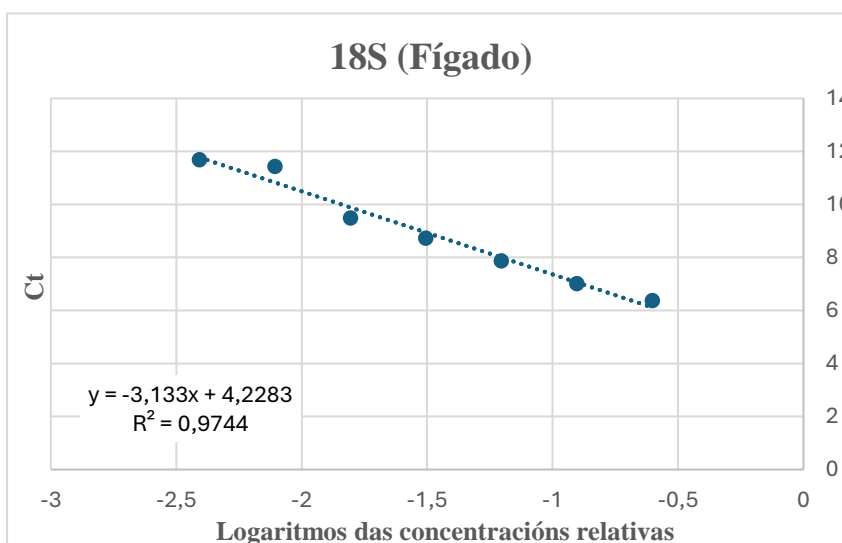
**Figura 10. Linearidade do ensaio dos cebadores de Ferritina de cadea lixeira en mostra de fígado.** Representáanse os valores de Ct (media de dúas medicións) do cebador FLC fronte os logaritmos das concentracións relativas das mostras de fígado.



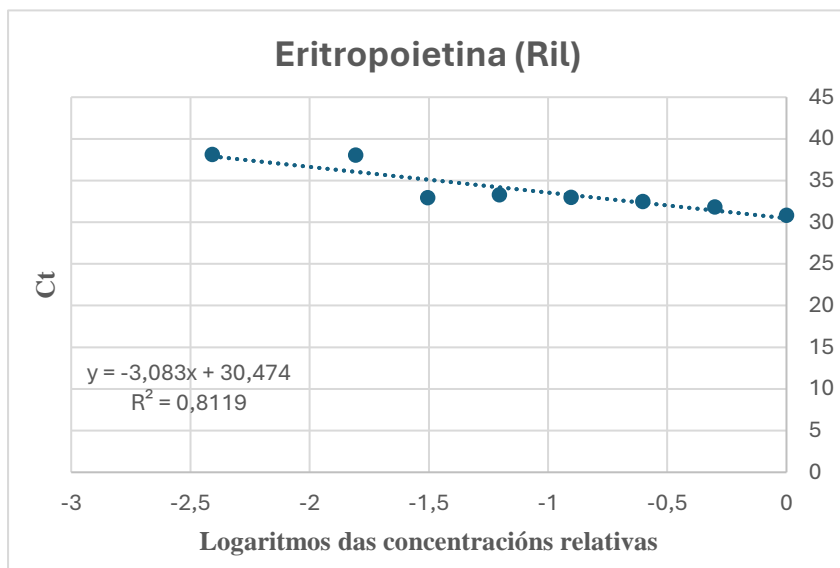
**Figura 11. Linearidade do ensaio dos cebadores de Ferritina de cadea pesada en mostra de fígado.** Representáanse os valores de Ct (media de dúas medicións) do cebador FHC fronte os logaritmos das concentracións relativas das mostras de fígado.



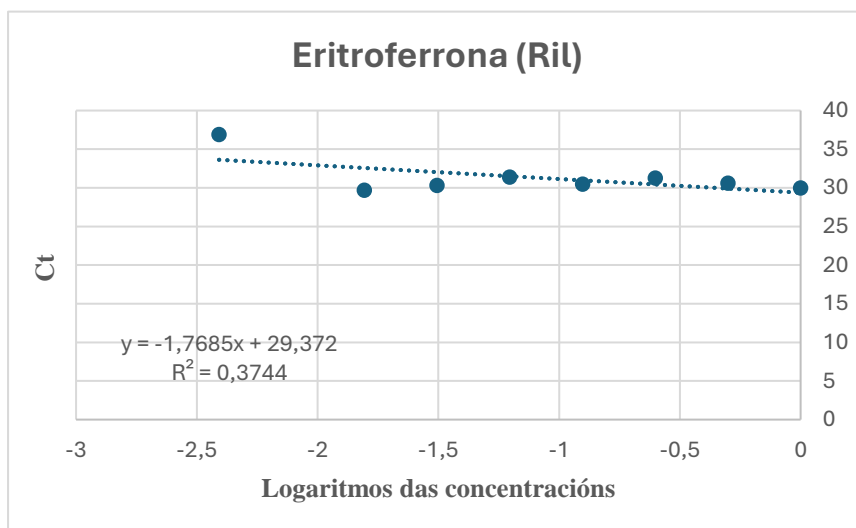
**Figura 12. Linearidade do ensaio dos cebadores de B-actina en mostra de fígado.** Representáanse os valores de Ct (media de dúas medicións) do cebador B-actina fronte os logaritmos das concentracións relativas das mostras de fígado.



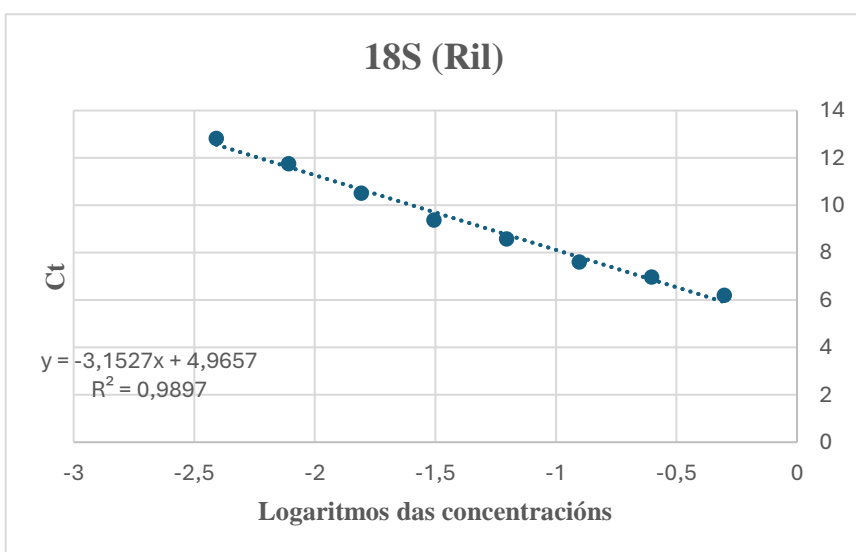
**Figura 13. Linearidade do ensaio dos cebadores de 18S en mostra de fígado.** Representáanse os valores de Ct (media de dúas medicións) do cebador 18S fronte os logaritmos das concentracións relativas das mostras de fígado.



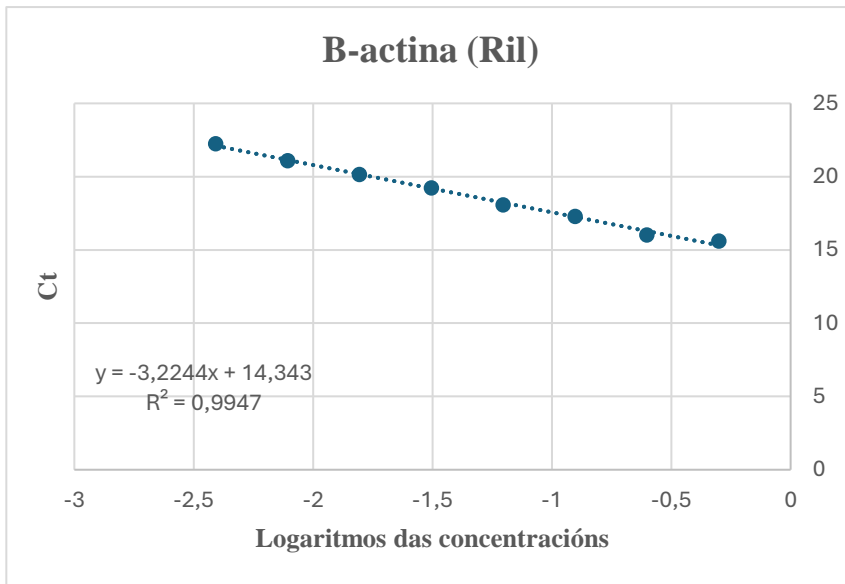
**Figura 14 . Linearidade do ensaio dos cebadores de Eritropoietina en mostra de ril.** Representáanse os valores de Ct (media de dúas medicións) do cebador EPO fronte os logaritmos das concentracións relativas das mostras de ril.



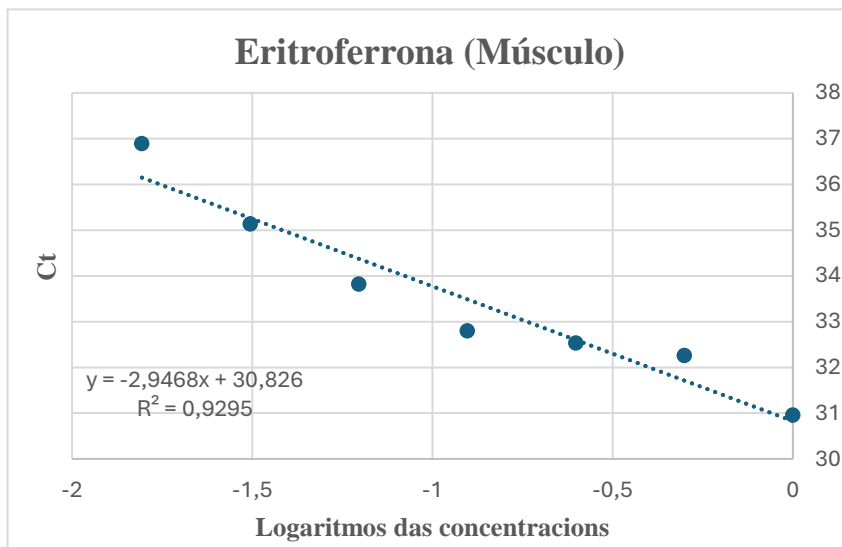
**Figura 15. Linearidade do ensaio dos cebadores de Eritroferrona en mostra de ril.** Representáanse os valores de Ct (media de dúas medicións) do cebador ERFE fronte os logaritmos das concentracións relativas das mostras de ril.



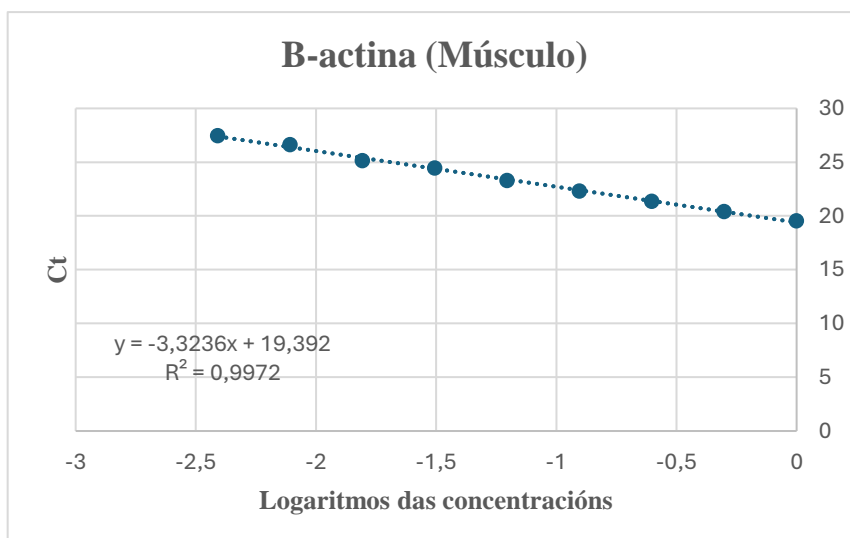
**Figura 16. Linearidade do ensaio dos cebadores de 18S en mostra de ril.** Representáanse os valores de Ct (media de dúas medicións) do cebador 18S fronte os logaritmos das concentracións relativas das mostras de ril.



**Figura 17. Linearidade do ensaio dos cebadores de B-actina en mostra de ril.** Representáanse os valores de Ct (media de dúas medicións) do cebador B-actina fronte os logaritmos das concentracións relativas das mostras de ril.



**Figura 18. Linearidade do ensaio dos cebadores de Eritroferrona en mostra de músculo.** Representáanse os valores de Ct (media de dúas medicións) do cebador ERFE fronte os logaritmos das concentracións relativas das mostras de músculo.

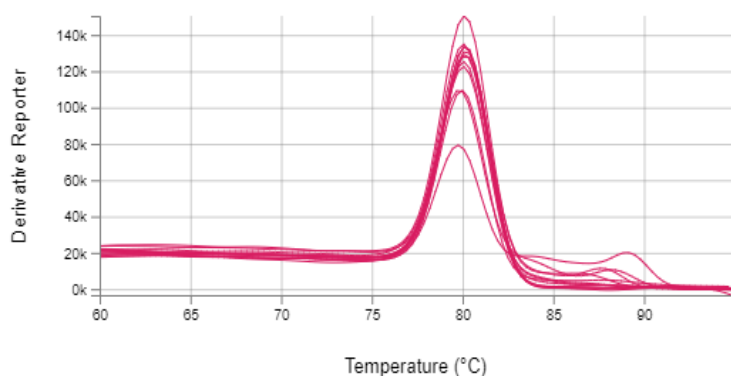


**Figura 19. Linearidade do ensaio dos cebadores de B-actina en mostra de músculo.** Representáanse os valores de Ct (media de dúas medicións) do cebador B-actina fronte os logaritmos das concentracións relativas das mostras.

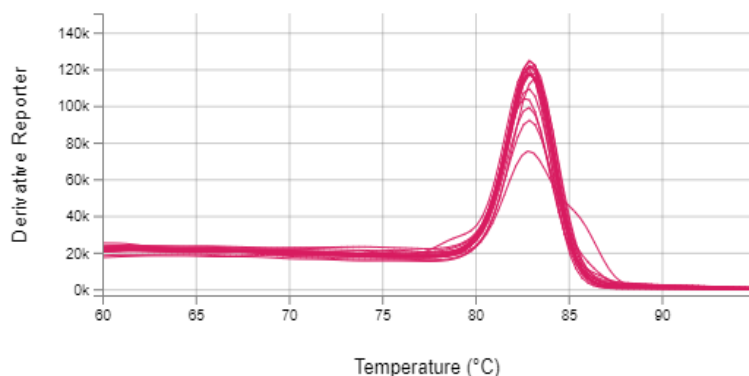
Nas figuras (7-19) observase:

- Unha linearidade con pendentes de valores entre -3,1 e -3,58 nos cebadores estudados no fígado, polo tanto, a eficacia de amplificación dos nosos procedementos estivo sobre un 100% e 110% xa que considerase que o 100% de efectividade prodúcese cun valor de -3,3219 (pódense observar os datos das eficiencias na Táboa 5).
- No caso dos cebadores de ril comprobamos que os resultados da eficiencia de amplificación para a EPO e boa (Figura 14) pero no caso do estudo dos cebadores utilizados para ERFE non amplifican correctamente (Figura 15), xa que o valor -1,7685 non é suficiente porque é inferior ao límite (-3,1), polo que temos que descartar este par de cebadores para este xene neste tecido, e deseñar un novo cebador.
- No caso do cebador de músculo, o ERFE, pasa como no caso anterior, no que a pendente non é suficiente para unha boa eficacia do proceso (Figura 18), polo que temos que descartar este cebador para os estudos de expresión de este xene no músculo.
- Ademais, os valores calculados do coeficiente de determinación ou  $R^2$  son próximos a 1 e indican que temos un axuste lineal moi bo.

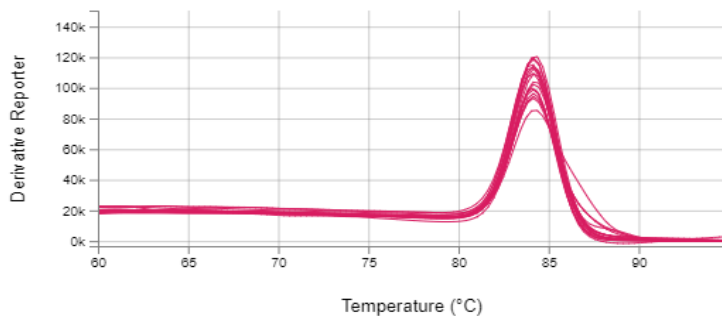
Ao mesmo tempo que obtivemos os datos para realizar as rectas o termociclador permítenos observar as curvas de *melting* de cada duplicado das concentracións do *Pool* coas que poderemos avaliar a especificidade dos produtos de amplificación e determinar se nas nosas mostras presentamos algún tipo de contaminación e se só se está a amplificar o noso xene de interese.



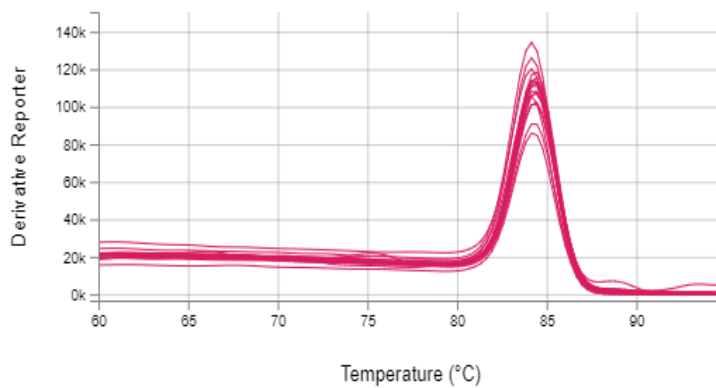
**Figura 20. Representación gráfica da curva de fusión da Hepcidina.** Representase un gráfico coa curva de fusión (derivada da fluorescencia fronte a temperatura) para os *primers* de hepcidina cun número de mostras total de 18 (9 dilucións do *Pool* de mostras de fígado por duplicado).



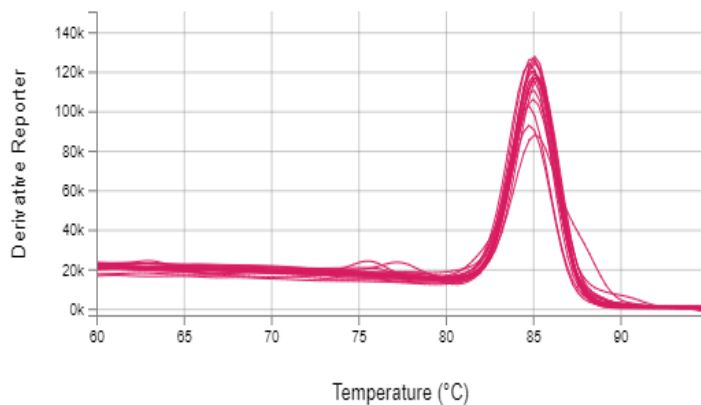
**Figura 21. Representación gráfica da curva de fusión da Ferroportina.** Representase un gráfico coa curva de fusión (derivada da fluorescencia fronte a temperatura) para os *primers* de ferroportina cun número de mostras total de 18 (9 dilucións do *Pool* de mostras de fígado por duplicado).



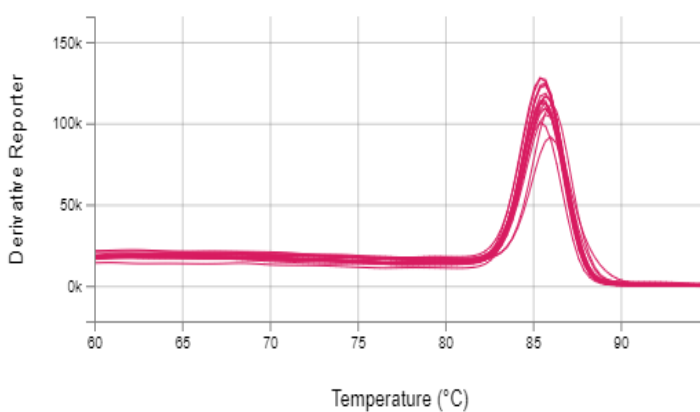
**Figura 22. Representación gráfica da curva de fusión da Transferina.** Representátese un gráfico coa curva de fusión (derivada da fluorescencia fronte a temperatura) para os *primers* de transferrina cun número de mostras total de 18 (9 dilucións do *Pool* de mostras de figado por duplicado).



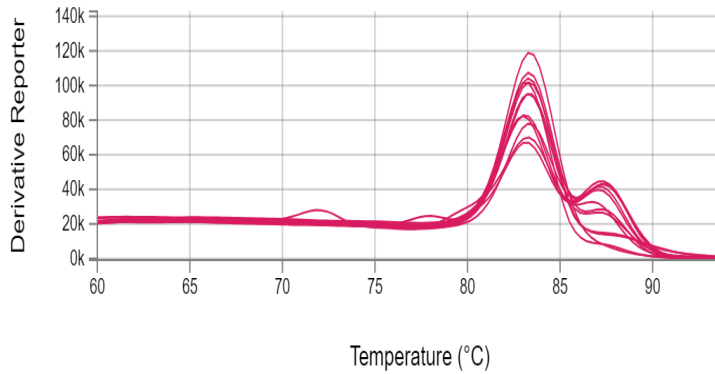
**Figura 23. Representación gráfica da curva de fusión da Ferritina de cadea lixeira.** Representátese un gráfico coa curva de fusión (derivada da fluorescencia fronte a temperatura) para os *primers* de ferritina de cadea lixeira cun número de mostras total de 18 (9 dilucións do *Pool* de mostras de figado por duplicado).



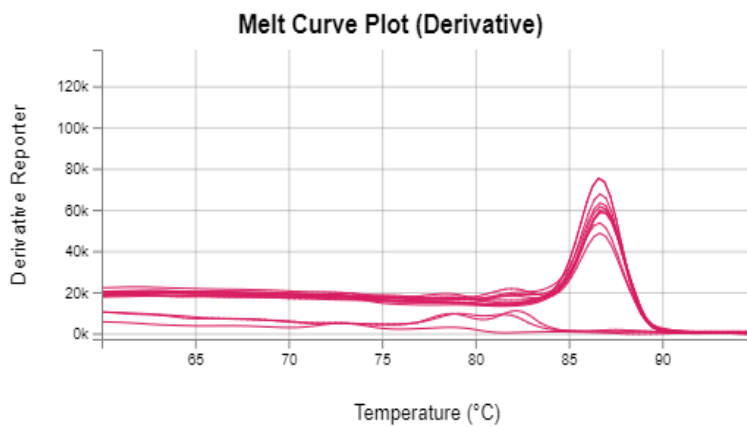
**Figura 24. Representación gráfica da curva de fusión da Ferritina de cadea pesada.** Representátese un gráfico coa curva de fusión (derivada da fluorescencia fronte a temperatura) para os *primers* de ferritina de cadea pesada cun número de mostras total de 18 (9 dilucións do *Pool* de mostras de figado por duplicado).



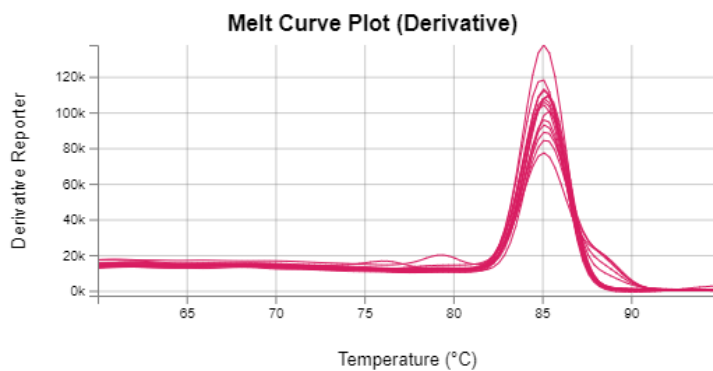
**Figura 25. Representación gráfica da curva de fusión da B-actina no figado.** Representátese un gráfico coa curva de fusión (derivada da fluorescencia fronte a temperatura) para os *primers* de B-actina cun número de mostras total de 18 (9 dilucións do *Pool* de mostras de figado por duplicado).



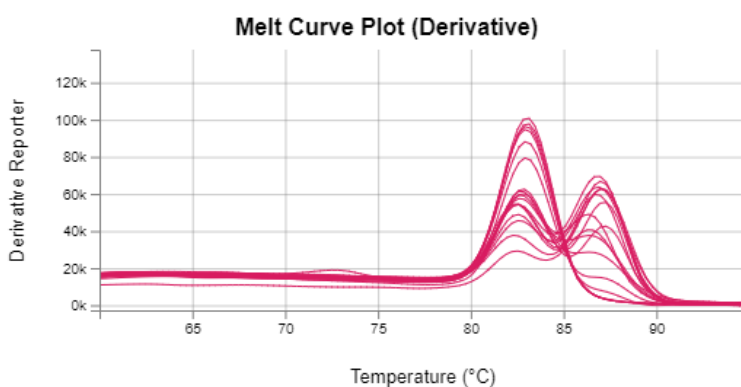
**Figura 26. Representación gráfica da curva de fusión do 18S no figado.** Representátese un gráfico coa curva de fusión (derivada da fluorescencia fronte a temperatura) para os *primers* de 18S cun número de mostrás total de 18 (9 dilucións do *Pool* de mostrás de figado por duplicado).



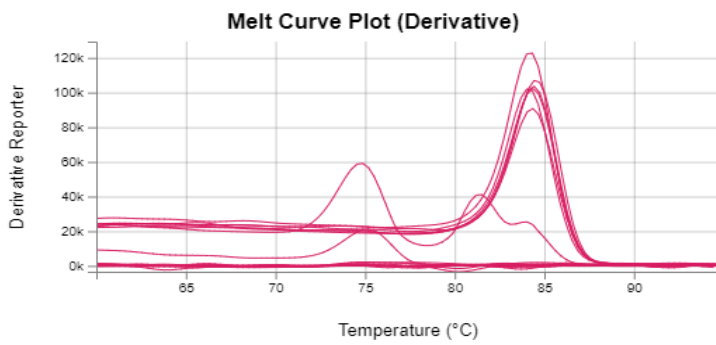
**Figura 27. Representación gráfica da curva de fusión da Eritropoietina no ríl.** Representátese un gráfico coa curva de fusión (derivada da fluorescencia fronte a temperatura) para os *primers* de eritropoietina cun número de mostrás total de 18 (9 dilucións do *Pool* de mostrás de ríl por duplicado).



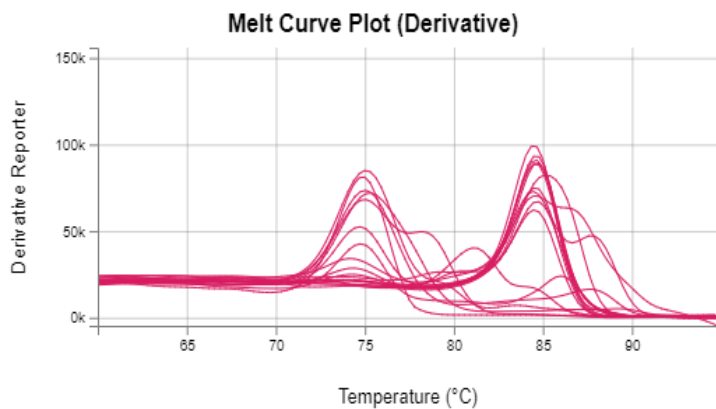
**Figura 28. Representación gráfica da curva de fusión da B-actina no ríl.** Representátese un gráfico coa curva de fusión (derivada da fluorescencia fronte a temperatura) para os *primers* de B-actina cun número de mostrás total de 18 (9 dilucións do *Pool* de mostrás de ríl por duplicado).



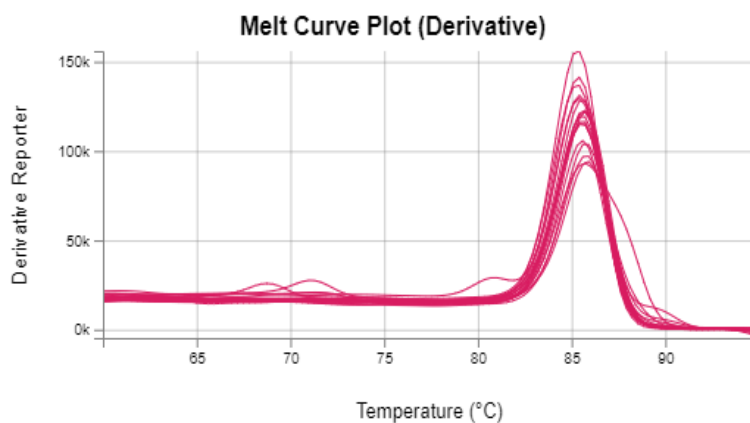
**Figura 29. Representación gráfica da curva de fusión do 18S no ríl.** Representátese un gráfico coa curva de fusión (derivada da fluorescencia fronte a temperatura) para os *primers* de 18S cun número de mostrás total de 18 (9 dilucións do *Pool* de mostrás de ríl por duplicado).



**Figura 30. Derivada da curva de fusión da Eritroferrona no ril.** Representase un gráfico coa curva de fusión (derivada da fluorescencia fronte a temperatura) para os *primers* de eritroferrona cun número de mostras total de 18 (9 dilucións do *Pool* de mostras de ril por duplicado).



**Figura 31. Representación gráfica da curva de fusión da Eritroferrona no músculo.** Representase un gráfico coa curva de fusión (derivada da fluorescencia fronte a temperatura) para os *primers* de eritroferrona cun número de mostras total de 18 (9 dilucións do *Pool* de mostras de músculo por duplicado).



**Figura 32. Representación gráfica da curva de fusión da B-actina no músculo.** Representase un gráfico coa curva de fusión (derivada da fluorescencia fronte a temperatura) para os *primers* de B-actina cun número de mostras total de 18 (9 dilucións do *Pool* de mostras de músculo por duplicado).

Por un lado, nas figuras (20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 32) podemos observar que todos os cebadores amplifican de maneira correcta e que ningunha solución está contaminada, é dicir, que nin o *Pool* de mostras nin os *Mix* dos cebadores están danados por outras substancias.

Polo tanto, neste punto considerase que a PCR está optimizada pois determinamos coas rectas que dilución de cada mostra imos coller para cada determinado par de cebadores, sendo esta a dilución que corresponda co *Ct* que atopamos como punto medio da recta. Do mesmo xeito, comprobamos que as nosas mostras non conteñen impurezas.

Por outro lado, nas figuras (26, 29, 30, 31) podemos ver que se están amplificando máis dunha sustancia, xa que as curvas de *melting* non están dispostas solo sobre un determinado intervalo de temperatura, se non que aparecen amplificacións de varias moléculas en varios tramos de temperatura. Isto o que indica é que a mostra pode estar contaminada ou o cebador pode estar mal deseñado.

Unha vez realizadas as validacións compárense as rectas de amplificación dos xenes de estudo coas rectas dos *Housekeepings* para determinar que *Housekeeping* nos serve como xene normalizador. Para isto, en Excel substituímos nas rectas obtidas na validación (punto 4.1.1.) o valor X polos valores dos logaritmos das concentracións relativas obtendo unha columna que denominamos “CT (Nome da molécula de estudo)” e ao lado facemos outra columna substituíndo nas rectas dos *Housekeepings* o valor X polos logaritmos das concentracións relativas obtendo a columna “CT (*Housekeeping*)”. Finalmente, restamos cadanseu valor respectivo da columna (“CT (Nome da molécula de estudo)” – “CT (*Housekeeping*)”) e representamos estes valores obtidos fronte as concentracións relativas: 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.0078125, 0.00390625.

Desta representación obteremos unha recta cuxa pendente debe ser  $\pm 0,1$  ou valores inferiores para considerarse válido o emprego comparativo de determinado xene de estudo co *Housekeeping*. Os resultados obtidos recóllense na Táboa 6.

**Táboa 6: Resumo final tralo análise previo dos xenes de estudo e dos *Housekeepings***

Xene de estudo	<i>Housekeeping</i>	Ecuación da recta	
HAMP (Fígado)	B-actina	$y = 0,0657x + 1,716$	1
FERRO (Fígado)	18S	$y = -0,0226x + 17,54$	1
TRANSF (Fígado)	18S	$y = 0,0217x + 8,9277$	1
FLC (Fígado)	B-actina	$y = -0,0155x + 8,856$	1
FHC (Fígado)	18S	$y = -0,0266x + 11,717$	1
EPO (Ril)	B-actina	$y = -0,1531x + 15,337$	1
ERFE (Músculo)	B-actina	-	-

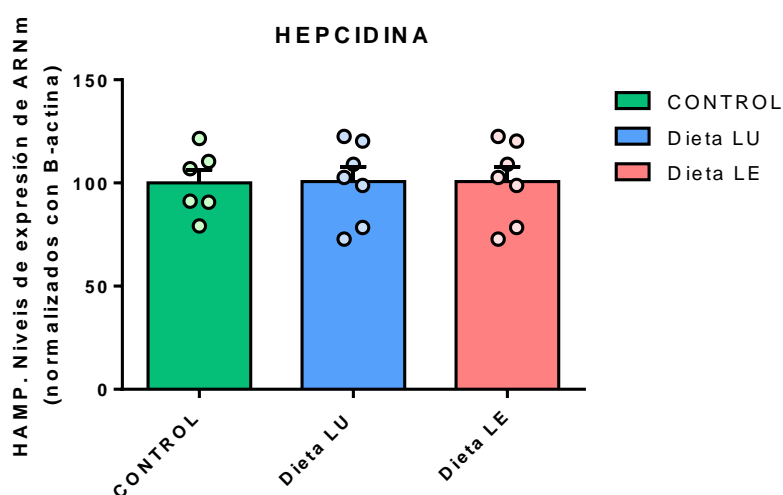
\*O xene normalizador do ERFE ou mionectina é a B-actina segundo a bibliografía atopada, polo cal non realizámolo calculo.

Na Táboa 6 obsérvase:

- Nas comparacións que obtemos unha linearidade cunha pendente con valores que están entre -0,01 e -0,07; como son valores menores  $\pm 0,1$  considéranse válidas.
- Os valores de  $R^2$  dan un valor de 1 polo tanto podemos deducir que temos un axuste lineal perfecto, é dicir que as eficiencias de amplificación do xene de estudo e o xene normalizador (*Housekeeping*) son iguais no tecido estudado e polo tanto permítenos saber que xene *Housekeeping* utilizaremos como control para un xene concreto no tecido a estudar.

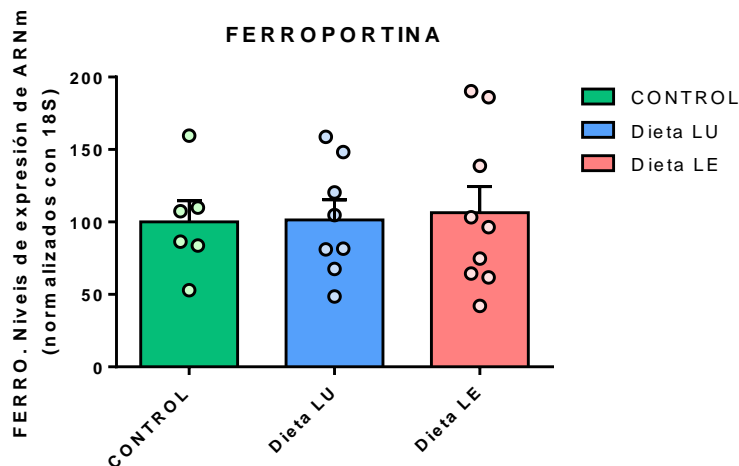
## 4.2 Análise dos niveis de expresión de ARN dos xenes vinculados ao metabolismo do ferro.

Avaliouse os niveis de expresión do ARNm de varios xenes que están vinculados co metabolismo do ferro para determinar como afectaron as diferentes dietas na hemostases do ferro no fígado de ratas *Sprague-Dawley*. Algunhas destas moléculas reguladoras se producen e segregan no músculo e ril.



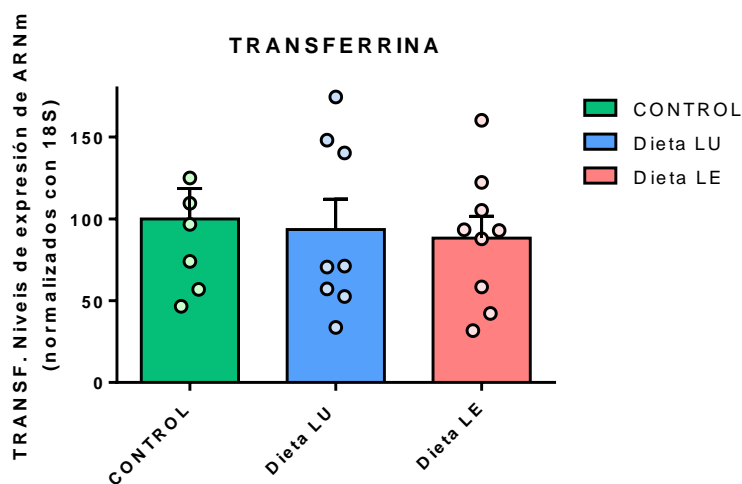
**Figura 33. Niveis de expresión de ARNm de Hepsidina no fígado.** Representase como porcentaxe de variación o ARNm do grupo CONTROL fronte o ARNm dos grupos experimentais. As barras representan as medias e os puntos son os individuos de cada grupo. Os datos representanse como Media  $\pm$  EEM (error estándar da media). Control n (6), Dieta LU (7) Dieta LE (8). Test One-way ANOVA seguido de test Post-hoc HSD Turkey.

Na figura 33 observase que a administración das dieta LU e LE non supuxeron un cambio nos niveis de expresión de ARNm de Hepsidina no fígado respecto ao grupo CONTROL.



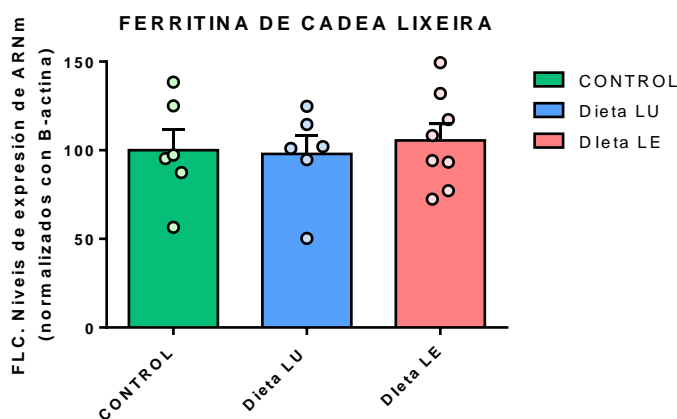
**Figura 34. Niveis de expresión de ARNm de Ferroportina no fígado.** Representase como porcentaxe de variación o ARNm do grupo CONTROL fronte o ARNm dos grupos experimentais. As barras representan as medias e os puntos son os individuos de cada grupo. Os datos representanse como Media  $\pm$  EEM (error estándar da media). ). Control n (6), Dieta LU (8) Dieta LE (9). Test One-way ANOVA seguido de test Post-hoc HSD Turkey.

Na figura 34 obsérvase que a administración da dieta LU e da dieta LE non supuxo ningún cambio significativo nos niveis de expresión de ARNm de Ferroportina nos grupos experimentais respecto ao grupo CONTROL. Obsérvase unha importante dispersión de valores en todos os grupos, incluíndo o control.



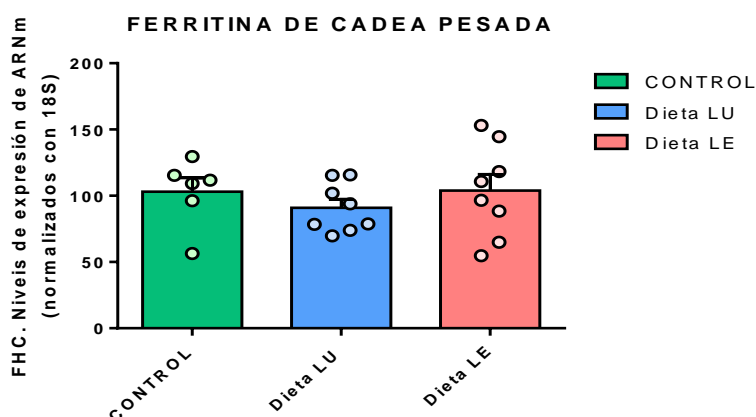
**Figura 35. Niveis de expresión de ARNm de Transferrina no fígado.** Representase como porcentaxe de variación o ARNm do grupo CONTROL fronte o ARNm dos grupos experimentais. As barras representan as medias e os puntos son os individuos de cada grupo. Os datos representanse como Media  $\pm$  EEM (error estándar da media). ). Control n (6), Dieta LU (8) Dieta LE (9). Test One-way ANOVA seguido de test Post-hoc HSD Turkey.

Na figura 35 observase que a administración da dieta LU e da dieta LE aos grupos experimentais non supuxo ningún cambio significativo nos niveis de expresión de ARNm de Transferrina respecto ao grupo CONTROL. Novamente obsérvase unha considerable dispersión dos valores en todos os grupos.



**Figura 36. Niveis de expresión de ARNm de Ferritina de cadea lixeira no fígado.** Representátese como porcentaxe de variación o ARNm do grupo CONTROL fronte o ARNm dos grupos experimentais. As barras representan as medias e os puntos son os individuos de cada grupo. Os datos representátese como Media  $\pm$  EEM (error estándar da media). Control n (6), Dieta LU (6) Dieta LE (8). Test One-way ANOVA seguido de test Post-hoc HSD Turkey.

Na figura 36 observase que a administración da dieta LU e da dieta LE aos grupos experimentais non supuxo ningún cambio significativo nos niveis de expresión de ARNm de Ferritina de cadea lixeira respecto ao grupo CONTROL. Obsérvase unha importante dispersión dos valores en todos os grupos.



**Figura 37. Niveis de expresión de ARNm de Ferritina de cadea pesada no fígado.** Representátese como porcentaxe de variación o ARNm do grupo CONTROL fronte o ARNm dos grupos experimentais. As barras representan as medias e os puntos son os individuos de cada grupo. Os datos representátese como Media  $\pm$  EEM (error estándar da media). Control n (6), Dieta LU (8) Dieta LE (8). Test One-way ANOVA seguido de test Post-hoc HSD Turkey.

Na figura 37 observase que a administración da dieta LU e da dieta LE aos grupos experimentais non supuxo ningún cambio significativo nos niveis de expresión de ARNm de Ferritina de cadea pesada respecto ao grupo CONTROL.

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Resultado da validación para os xenes de estudo e os xenes normalizadores (*Housekeeping*) para a optimización da PCR.

Para o presente experimento empregáronse cebadores de diferente natureza. En primeiro lugar, seleccionáronse algúns cebadores de entre os descritos na literatura científica: hepcidina e ferroportina (Novoa, A. et al., 2014) así como a transferrina (Zhang et al., 2004). Posteriormente, redeseñáronse o resto de cebadores empregando as secuencias descritas no GenBank destas moléculas, coa axuda do *software* Primer-Blast.

Todos os *primers* foron testados seguindo as mesmas condicións e procedementos recollidos nas instrucións da bibliografía (Pfaffl, 2001)(Sint D et al., 2012).

Inicialmente, realizouse unha validación co tecido no que se desexa estudar a súa expresión para comprobar se esta existía. Esta validación observouse nos datos que nos achega a PCR cando detecta amplificación de ciclos, é dicir, cando recibimos datos de Ct. No caso da interleucina 6, non obtivemos ningún dato, co cal determinamos que o cebador estaba mal deseñado ou que esta molécula non tiña expresión suficiente no fígado, que foi o tecido de estudo. Contrariamente, se obtiñamos datos, analizamos se o cebador amplificaba de maneira axeitada, valorando ao mesmo tempo a eficiencia desta amplificación na PCR-*real time*. Para isto creamos uns gráficos das rectas dos ciclos obtidos na PCR, representando o logaritmo da concentración relativa das mostras de tecido fronte os Ct. Dentro da recta é importante destacar o valor da pendente (m) que correspondente a eficiencia dun ciclo. Considéranse válidos aqueles cebadores que presentan unha eficiencia entre o 90% e o 110%, é dicir, unha pendente entre -3,58 e -3,10 (Sint D et al., 2012). Como se observar nas figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17 e 19 os resultados mostran uns cebadores que se atopan optimizados para unha boa amplificación da PCR. Non obstante, nas figuras 15 e 18 non se conseguiron resultados óptimos a pesar de realizar o estudo dúas veces. O resultado negativo pódenos levar a dúas conclusións: que os cebadores deseñados non serve para os xenes de estudo neste tecido, e polo tanto teríanse que deseñar novos cebadores ou que non exista expresión dos xenes de estudo neste tecido.

Ademais, é fundamental realizar un estudo das curvas de fusión de todos os cebadores para comprobar a especificidade dos produtos amplificados, que non existe contaminación, e que a lonxitude do produto de amplificación ocorre nun mesmo intervalo de temperatura. Para este análise empréganse os datos brutos obtidos da PCR empregando o *Software* Quantio Studio 6. Nas figuras (20-32) podemos observar os datos obtidos. Todos os cebadores amplifican correctamente agás o 18S nos tecidos de fígado e ril (Figuras 26 e 29), no que tras realizar tres

probas de validacións para obter o mellor resultado determinouse que este par de cebadores pode presentar unha posible contaminación. Esta suposición débese a que anteriormente foi empregado por outros membros do grupo de investigación e os seus resultados foron óptimos. A pesar desta posible contaminación, empregouse como xene normalizador no fígado porque considérase mínima. Porén, o cebador ERFE, ao igual que na validación da eficiencia, deu uns resultados reprobables como podemos observar nas figuras 30 e 31.

A PCR é unha técnica moi eficiente, xa que a polimerasa comete moi poucos erros, aproximadamente 1 cada 100.000 moléculas. A medida que esta reacción avanza nos ciclos, a probabilidade de cometer un erro aumenta, de maneira que, se nalgún punto da PCR unha molécula se amplifica cun erro e este se fixa, nos ciclos posteriores teremos millóns de moléculas erróneas que poden dar unha lectura positiva. Por isto, obter ciclos moi altos pode causar un gran número de erros que probablemente se estean recoñecendo como outras secuencias que non son a que se busca. Isto é o que suxerimos que ocorreu cos cebadores de ERFE. Outra posibilidade, é que o cebador estivese mal deseñado, é dicir, que non fose específico desta molécula porque a secuencia de nucleótidos dos cebadores é de 21 pb para que poidan ser recoñecidos pola súa especificidade coa secuencia do templado, é dicir, a secuencia de nucleótidos do xene de lonxitudes moi largas aumentan a temperatura de *melting* dos cebadores e polo tanto, inflúen na temperatura de *annealing*, por iso precisamos unha lonxitude relativamente pequena. A pesar diso, esta secuencia é moi pequena en comparación co xenoma e podería estar repartida no xenoma do organismo millóns de veces formando parte doutras moléculas. Para evitar isto, sería necesario realizar un estudo xenético do promotor ou da secuencia codificante. Para isto, teríamos que coller na bibliografía todas as posibles secuencias descritas de ERFE e facer un estudo de aliñamento. Deste xeito, escolleríamos unha secuencia máis concreta da molécula de interese, pero este proceso é laborioso e non foi posible realizalo por falta de tempo, de maneira que non puidemos obter información dos niveis de expresión da eritroferrona.

Para o deseño de cebadores requírese de moitos requisitos previos que son determinantes para o éxito duns resultados óptimos, como son: a lonxitude, o contido de guanina-citosina, a temperatura de fusión ou *melting* ( $T_m$ ) (que sexa o máis similar entre os pares de cebadores), a temperatura de *annealing* ( $T_a$ ). Esta última é crítica, xa que, si é alta os cebadores hibridan mal e inflúe no rendemento do ADN amplificado; pola contra si é demasiado baixa pode ocorrer a hibridación inespecífica polo que resultaría na amplificación de fragmentos de AND non desexados (Yang et al., 2005).

A pesar de que hoxe en día atopamos múltiples programas que axudan a avaliar as diferentes características dos pares de *primers*, non sempre se conseguen cebadores óptimos posto que son moitas as variables implicadas (Bolívar, M. et al., 2014).

## **5.2 Efecto do tratamento cunha dieta baseada en proteínas vexetais sobre dous grupos experimentais.**

Estudos previos recollidos na bibliografía demostran que as dietas baseadas en proteínas vexetais frecuentemente presentan deficiencias nutricionais intrínsecas en varios elementos esenciais como zinc, iodo ou ferro (Selinger et al., 2022). Por outra banda, os vexetais, e especialmente as legumes, conteñen cantidades relevantes de anti-nutrintes como fitatos, oxalatos e lectinas que afectan a absorción do ferro non hemo (Soto-Aguilar et al., 2021) (Gonzalez-Corbella, M. J. (2005). Polo tanto, esperase que os animais experimentais cuxa dieta careza do compoñente proteico de orixe animal, e solo dispoñan de extractos de legumes, como é o caso, poidan desenvolver un déficit de ferro en comparación cos animais do grupo control. Debemos considerar, que os extractos de legume cos que se compoñe a dieta dos grupos experimentais consta de ao menos un 85% de proteína (lupino ou lentella), e un 15% doutros compostos que inclúen carbohidratos, graxas (ata un 8% en lupino), e materiais variados con cantidades indeterminadas de oxalatos e fitatos.

É interesante subliñar que os antecedentes hematolóxicos que se realizaron por parte doutros membros do grupo de investigación amosaron que houbo un claro incremento nos indicadores da serie vermella sanguínea, con elevación no recuento de eritrocitos, elevación de hematocrito e hemoglobina, sen cambios na morfoloxía das células sanguíneas, é dicir, o seu tamaño e volume son normais. Así mesmo, mantivéronse niveis normais de concentración de hemoglobina en ambos os dous grupos experimentais o que indica que non existe déficit de folato, ou de vitamina B12 nas dietas. Todo o cal permitiu hipotetizar que os animais que consumían as dietas con proteína de orixe vexetal tiñan unha mellora no metabolismo do ferro, como elemento limitante da produción de células eritroéticas sanguíneas.

Unha das moléculas nas que pivota a regulación do metabolismo hepático do ferro é a hepcidina para a que recentemente se propuxo un papel central no control das reservas de ferro (Coffey & Ganz, 2018)(Ginzburg, Y. Z., 2019). Existe un único transportador de ferro coñecido e chamado ferroportina, que é responsable da absorción intestinal deste mineral, da súa incorporación ao fígado e as células hematopoéticas da medula ósea. A hepcidina únese a ferroportina, e a bloquea favorecendo deste xeito a súa degradación, polo que reduce drasticamente a absorción e biodisponibilidade de ferro no organismo. Ao mesmo tempo, esta acción resulta na retención de ferro nas células e no acumulo das reservas de Fe intracelular, especialmente no fígado. Polo tanto, cando as reservas están baixas, a hepcidina exprésase en niveis baixos para potenciar a absorción intestinal de ferro. Contrariamente, en situacións de altas reservas, observa unha maior expresión de hepcidina que conduce a unha diminución da absorción.

Malia isto, cabe destacar que aínda non se definiu completamente o mecanismo exacto polo que a hepcidina exerce o seu efecto sobre a absorción intestinal de ferro. Este proceso é complexo e necesita do transporte de ferro a través do epitelio, dende o sitio de absorción na

membrana do borde en cepillo (BBM) ata o sitio de saída na membrana basolateral (BLM). A hepcidina pode regular esta absorción modulando a expresión de calquera das moléculas involucradas na absorción intestinal, sendo o seu obxectivo principal o transportador de ferro, a ferroportina (Nemeth & Ganz, 2021) (Varga et al., 2021).

Por tolo elo, no noso experimento esperaríamos unha diminución na expresión da hepcidina nos grupos experimentais, xa que se observa un claro incremento na produción da serie vermella sanguínea e polo tanto, unha dispoñibilidade de ferro suficiente para abastecer unha demanda incrementada. A hepcidina aparece negativamente regulada en condicións de hipoxia, eritropoiese ou déficit de ferro. Consecuentemente, a ferroportina debería mostrar un incremento na súa expresión porque non estaría sendo eliminada pola acción da hepcidina. Por outra banda, a expresión da transferrina manterase ou aumentará para facilitar o transporte de ferro ao longo do organismo entre os lugares de absorción (intestino), regulación (fígado) e consumo (células hematopoiéticas da médula ósea e outras). No caso da ferritina sucederá algo parecido pero a súa expresión manterase igual ou aumentará para ligar o ferro dispoñible no interior das células, especialmente no fígado.

Os resultados obtidos non amosaron a resposta esperada nos grupos experimentais en comparación co grupo control. Observamos que a expresión de todas as moléculas implicadas no control do metabolismo do ferro no fígado (hepcidina, ferroportina, transferrina, ferritina de cadea lixeira e ferritina de cadea pesada) manteñen os mesmos niveis de expresión de ARNm.

O feito de que non atopemos ningún cambio relevante na expresión das moléculas estudadas non indica necesariamente que non este mellorado o transporte, xa que se mantén a mesma cantidade de ferroportina, transferrina ou de ferritina, polo que o ferro circulante atópase máis dispoñible para unha demanda posiblemente incrementada. Debemos destacar, que na bioquímica sanguínea destes animais non se observou incremento de valores de bilirrubina, a principal molécula de degradación do grupo hemo da hemoglobina, polo que non se produce unha maior destrución de eritrocitos, que poida xustificar un incremento do ferro dispoñible para o seu reciclado e abastecemento da eritropoiese. Podemos entón determinar que con máis cantidade de ferro circulante, este atópase probablemente máis dispoñible para as súas funcións.

Esta é unha explicación endóxena, na que observamos que non hai modificacións relevantes nas principais proteínas reguladoras do metabolismo do ferro, polo tanto, seguidamente analizáronse tamén a eritropoietina e a eritroferrona, moléculas importantes para estimular a eritropoiese e que puideran ser alteradas como consecuencia da dieta. A eritropoietina é a principal sinal que desencadea a eritropoiese en condicións anémicas e hipóxicas. Como consecuencia, é razoable a existencia dunha participación directa da EPO na regulación da hepcidina. A súa vez, o aumento da expresión de EPO conduce a unha expansión dos precursores eritroides, os cales segregan eritroferrona (Corrales-Agudelo et al., 2017) (Pinto et al., 2008). Esta molécula intervéen na unión dun conxunto específico de proteínas morfoxénicas óseas (*Bone Morphogenic Protein*) cos seus respectivos receptores provocando a interrupción da vía de sinalización intracelular BMP/SMAD, e como resultado, a diminución da expresión de hepcidina no fígado. O ERFÉ recibe tamén o nome de mionectina, porque se expresa no músculo e se segrega durante o exercicio físico, vinculando así o aumento da demanda de

oxíxeno polo exercicio continuado co necesario incremento da eritropoiese (Coffey & Ganz, 2018).

No noso experimento, cabería esperar un aumento na expresión de EPO e consecuentemente de ERFE para explicar a eritropoiese incrementada. Porén, os resultados obtidos para os niveis de expresión da EPO nos grupos experimentais non foron concluíntes e por falta de tempo non se puido realizar un novo estudo, co cal non se atopou ese aumento de EPO que poida xustificar o aumento nos indicadores das células sanguíneas.

Unha vez descartadas as principais moléculas implicadas no control da eritropoiese, a nosa atención podería centrarse noutras moléculas que ata o momento non foron consideradas tan relevantes na eritropoiese. Dende este punto de vista, cabe mencionar que outros membros do grupo de investigación atoparon un incremento moi marcado da hormona FGF21 no fígado de ámbolos dous grupos experimentais con dieta contendo proteína de legume (LU e LE). Outros estudos realizados en pez zebra vincularon FGF21 á hematopoiese (Yamauchi et al., 2006) (Nishimura et al., 2000), considerándoa unha hormona importante non só para a eritropoiese senón tamén para a mielopoiese, a produción de células da serie branca. Elo axudaría a explicar os nosos resultados porque non só se produce un aumento na serie vermella sanguínea, senón que tamén se incrementou a serie branca, especialmente neutrófilos, e incluso as plaquetas. Alén disto, sábese que FGF21 é estimulada pola eritropoietina, o que confirma a súa relación funcional coa eritropoiese. Do mesmo xeito, a regulación desta hormona está influenciada pola inxesta de carbohidratos (niveis altos) e pola biodispoñibilidade de proteínas (niveis baixos) estimulando a produción de FGF21. Así o FGF21 parece servir como nexo vinculante entre os cambios dietéticos e a dispoñibilidade de macronutrintes coa hematopoiese. (Hill et al., 2020).

Neste contexto, esta información podería constituír unha hipótese a ter en conta para futuros traballos, xa que o metabolismo do ferro non está completamente elucidado, é máis complexo e interveñen distintas outras sinais hormonais e metabólicas que compre integrar e explicar conxuntamente. E o mesmo se pode dicir da regulación da hematopoiese.

## VI. CONCLUSIÓNS

1. Realizouse un deseño e optimización dos cebadores dos xenes de estudo correctos para empregar a técnica da PCR *real time* e así poder cuantificar no tecido hepático as principais moléculas involucradas na regulación do metabolismo do ferro: hepcidina, ferroportina, ferritina de cadea lixeira, ferritina de cadea pesada e transferrina. O ARNm destas moléculas foi detectado de forma fiable e reproducible no fígado de ratas.
2. No caso da eritroferrona non se puido realizar análise de expresión nos tecidos de interese (músculo e ril) porque os cebadores non produciron un produto específico de amplificación. Ó mesmo ocorreu coa interleucina 6 que non se poido optimizar. Este feito recalca a necesidade da validación e optimización das condicións da PCR-*real time* nos distintos tecidos, previa a realización da cuantificación nas mostras experimentais.
3. A falta de cambios na expresión das moléculas a estudo nos grupos con dieta baseada con proteína só de orixe vexetal-leguminosa, permite rexeitar a hipótese de partida. Consecuentemente, os cambios previamente observados nos indicadores da liña sanguínea vermella non dependen de cambios no metabolismo do ferro, e si doutros cambios metabólicos ou hormonais. Por necesidades de estudo tamén se optimizaron a EPO e a ERFE nos tecidos correspondentes: ril e músculo. Non se observaron cambios na súa expresión, polo que se pode descartar a súa participación nos cambios hematolóxicos dos grupos experimentais a dieta con proteína de legumes.
4. O conxunto dos resultados obtidos permítenos concluír que debemos persistir en identificar outros sistemas reguladores que permitan vincular os cambios na dieta coa hematopoiese. O FGF21 constitúese coma unha molécula candidata, producida no fígado, de potencial relevancia.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J. J., Cánovas, A., De La Prieta, R., Pereira, T., Ruiz, C., & Aguirre, C. (2017). *Conceptos generales sobre el metabolismo del hierro General basis of iron metabolism.* (Vol. 99, Issue 2) <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-medica-bilbao-316-articulo-conceptos-generales-sobre-el-metabolismo-S0304485802743928>
- Aozani, K., & Nunes, M. (2015). Hepcidin as a Regulator of Iron Homeostasis: A Review. *In International Journal of Health Sciences and Research.* [https://www.ijhsr.org/IJHSR\\_Vol.6\\_Issue.2\\_Feb2016/54.pdf](https://www.ijhsr.org/IJHSR_Vol.6_Issue.2_Feb2016/54.pdf)
- Barrios, M. F. (2016). Regulación del metabolismo del hierro: dos sistemas, un mismo objetivo Iron metabolism regulation: two systems, one goal. *In Revista Cubana de Hematología, Inmunol y Hemoter* (Vol. 32, Issue 1). <http://scielo.sld.cu>
- Bolívar, M. Moreno, A., Mérida, J., Rojas, A., García-Lugo, P., Rangel, M., & Francisco Torrealba, J. (2014). *PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol).* 3(1), 25–33.
- Coffey, R., & Ganz, T. (2018). Erythroferrone: An Erythroid Regulator of Hepcidin and Iron Metabolism. *HemaSphere*, 2(2). <https://doi.org/10.1097/hs9.0000000000000035>
- Corrales-Agudelo, V., Parra-Sosa, B. E., & Burgos-Herrera, L. C. (2017). Proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro corporal. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 18(1), 95–116. <https://doi.org/10.17533/udea.penh.v18n1a08>
- Cuadrado-De Juan, M., (2021). Inhibidores de tipo proteínico presentes en dietas vegetales. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/48248/TFG-M-N2391.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ginzburg, Y. Z. (2019). Hepcidin-ferroportin axis in health and disease. *In Vitamins and Hormones* (Vol. 110, pp. 17–45). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.01.002>
- Giráldez Dávila, Alberto. (2008). *Breve historia de la experimentación animal.*
- Haider, L. M., Schwingshackl, L., Hoffmann, G., & Ekmekcioglu, C. (2017). The effect of vegetarian diets on iron status in adults: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 58(8), 1359-1374. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1259210>
- Hill, C. M., Qualls-Creekmore, E., Berthoud, H. R., Soto, P., Yu, S., McDougal, D. H., Münzberg, H., & Morrison, C. D. (2020). FGF21 and the physiological regulation of macronutrient preference. *In Endocrinology (United States)* (Vol. 161, Issue 3). Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/endo/bqaa019>

- Khor, B.H., Tallman D. A, Karupaiah, T., Khosla, P., Chan, M., Kopple, J. D., (2024). Nutritional Adequacy of Animal-Based and Plant-Based Asian Diets for Chronic Kidney Disease Patients: A Modeling Study. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8541170/>
- Nemeth, E., & Ganz, T. (2021). Heparin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22126493>
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., & Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica Et Biophysica Acta, N. Gene Structure And Expression/Biochimica Et Biophysica Acta. Gene Structure And Expression*, 1492(1), 203-206. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(00\)00067-1](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(00)00067-1)
- Novoa, A., Fernández, V., Videla, L., (2014). Cambios en la expresión de Heparina, Ferroportina y Ferritina en el preacondicionamiento hepático con hierro frente a la isquemia-reperfusión hepática. <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/183527/Novoa%20Arce%2C%20Angela%20%28Tesis%29.pdf?sequence=1>
- Nucífora, E. M. (2017). Heparina: la llave del metabolismo del hierro. In *Scielo* (Vol. 51, Issue 3) [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572017000300012&script=sci\\_arttext#no](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572017000300012&script=sci_arttext#no)
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 29, Issue 9).
- Pinto, J. P., Ribeiro, S., Pontes, H., Thowfeequ, S., Tosh, D., Lix Carvalho, F., & Porto, G. (2008). *Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBP*. <https://doi.org/10.1182/blood-2007>
- Qi, Z., Xia, J., Xue, X., Liu, W., Huang, Z., Zhang, X., Zou, Y., Liu, J., Liu, J., Li, X., Cao, L., Li, L., Cui, Z., Ji, B., Zhang, Q., Ding, S., & Liu, W. (2022). Codon-optimized FAM132b gene therapy prevents dietary obesity by blocking adrenergic response and insulin action. *International Journal Of Obesity*, 46(11), 1970-1982. <https://doi.org/10.1038/s41366-022-01189-x>
- Selinger, E., Neuenschwander, M., Koller, A., Gojda, J., Kühn, T., Schwingshackl, L., Barbaresko, J., & Schlesinger, S. (2022). Evidence of a vegan diet for health benefits and risks – an umbrella review of meta-analyses of observational and clinical studies. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 63(29), 9926-9936. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2075311>
- Sint D, Raso L, Traugott M., (2012) Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods Ecol Evol.*; 3(5):898-905. doi:10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x

- Soto-Aguilar, F., Webar, J., & Palacios, I. (2021). Whole food plant based diet: its mechanisms for the prevention and treatment of obesity. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 22(1), 162-170. <https://doi.org/10.25176/rfmh.v22i1.3616>
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). Staying Current: Technology The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*, 29, 151–159. <https://doi.org/10.1152/advan>
- Valdez Mijares, R., & Hernández Flores, C. (2018). Análisis de iniciadores con herramientas bioinformáticas libres en línea.22(64), 5-19. Retrieved from <http://repositorio.utm.mx:8080/jspui/handle/123456789/367>
- Varga, E., Pap, R., Jánosa, G., Sipos, K., & Pandur, E. (2021). IL-6 Regulates Hepcidin Expression Via the BMP/SMAD Pathway by Altering BMP6, TMPRSS6 and Tfr2 Expressions at Normal and Inflammatory Conditions in BV2 Microglia. *Neurochemical Research*, 46(5), 1224–1238. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03322-0>
- Yamauchi, H., Hotta, Y., Konishi, M., Miyake, A., Kawahara, A., & Itoh, N. (2006). Fgf21 is essential for haematopoiesis in zebrafish. *EMBO Reports*, 7(6), 649–654. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400685>
- Yang I, Kim YH, Byun JY, Park SR., (2003). Use of multiplex polymerase chain reactions to indicate the accuracy of the annealing temperature of thermal cycling. *Anal Biochem*. 2005;338(2):192-200. doi:10.1016/j.ab.2004.09.035
- Yeh, K.-Y., Yeh, M., & Glass, J. (2004). Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpgi. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286, 385–394. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00246.2003.-Hepcidin>
- Zhang, A. S., & Enns, C. A. (2018). A long sought after “receptor” for ERF? In *Blood* (Vol. 132, Issue 14, pp. 1463–1464). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-869586>
- Zhang, A. S., Xiong, S., Tsukamoto, H., & Enns, C. A. (2004). Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes. *Blood*, 103(4), 1509–1514. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2378>
- Zhao, Q., Zhang, C. L., Xiang, R. L., Wu, L. L., & Li, L. (2020). CTRP15 derived from cardiac myocytes attenuates TGFβ1-induced fibrotic response in cardiac fibroblasts. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 34(5), 591–604. <https://doi.org/10.1007/s10557-020-06970-6>

## ANEXOS

**Anexo 1: cadro cos resultados e cálculos resultado do Nanodrop.** Recóllense os datos obtidos do Nanodrop en ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e a súa pureza na columna 260/280 que en todos os casos é boa, xa que  $\geq 1,5$ . Os datos das mostras en rosa corresponden as mostras de fígado; os datos das mostras en amarelo corresponden as mostras de ril; os datos das mostras en laranxa corresponden coas mostras de músculo.

Nº das mostras	Nome das mostras	Acidos nucleicos ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Volume de mostra que contén 2 $\mu\text{g}$ ac. Nucleicos	Volume de DEPC H20	260/280
1	CO1	1,23	1,63	4,37	1,98
2	CO2	1,342	1,49	4,51	1,94
3	CO3	1,02	1,95	4,05	1,96
4	CO4	1,53	1,31	4,69	1,94
5	CO5	0,96	2,09	3,91	1,93
6	CO6	1,30	1,54	4,46	1,91
7	CO7	1,31	1,53	4,47	1,95
8	LU1	0,60	3,34	2,66	1,89
9	LU2	1,49	1,34	4,66	1,93
10	LU3	1,39	1,43	4,57	1,93
11	LU4	1,47	1,36	4,64	1,95
12	LU5	1,77	1,13	4,87	1,92
13	LU6	1,44	1,39	4,61	1,96
14	LU7	1,26	1,59	4,41	1,96
15	LU9	0,95	2,11	3,89	1,99
16	LU10	0,62	3,11	2,89	1,98
17	LE1	0,52	3,43	2,57	1,99
18	LE2	1,33	1,51	4,49	1,96
19	LE3	1,39	1,44	4,56	1,94
20	LE4	0,59	3,37	2,63	1,94
21	LE5	1,66	1,20	4,80	1,91
22	LE6	1,40	1,43	4,57	1,95

23	LE7	1,00	1,99	4,01	1,97
24	LE8	1,61	1,25	4,75	1,94
25	LE9	1,45	1,38	4,62	1,95
26	LE10	0,67	2,97	3,03	1,89
27	CO1	1,95	1,03	4,97	1,96
28	CO2	2,29	0,87	5,13	1,94
29	CO3	1,84	1,09	4,91	1,96
30	CO4	2,27	0,88	5,12	1,95
31	CO5	1,68	1,19	4,81	1,93
32	CO6	2,63	0,76	5,24	1,86
33	CO7	2,23	0,90	5,10	1,95
34	LU1	2,13	0,94	5,06	1,96
35	LU2	2,65	0,75	5,25	1,87
36	LU3	2,08	0,96	5,04	1,94
37	LU4	2,34	0,85	5,15	1,93
38	LU5	2,17	0,92	5,08	1,94
39	LU6	1,97	1,01	4,99	1,94
40	LU7	2,53	0,79	5,21	1,89
41	LU9	2,28	0,88	5,12	1,94
42	LU10	1,65	1,21	4,79	1,93
43	LE1	1,54	1,30	4,70	1,93
44	LE2	2,19	0,91	5,09	1,94
45	LE3	1,84	1,09	4,91	1,97
46	LE4	2,15	0,93	5,07	1,88
47	LE5	2,01	0,99	5,01	1,95
48	LE6	2,52	0,80	5,20	1,95
49	LE7	2,72	0,74	5,26	1,82
50	LE8	1,78	1,12	4,88	1,91
51	LE9	2,38	0,84	5,16	1,9
52	LE10	2,23	0,90	5,10	1,94
53	CO 1	0,38	5,2493	0,7507	1,89

52	CO3	0,36	5,51	0,49	1,9
53	CO4	0,48	4,17	1,83	1,89
54	CO6	0,67	2,97	3,03	1,95
55	CO7	0,61	3,28	2,72	1,96
56	CO8	0,78	2,55	3,45	1,72
57	LU1	0,51	3,94	2,06	1,88
58	LU 2	0,46	4,31	1,69	1,94
59	LU3	0,43	4,65	1,35	1,84
60	LU4	0,71	2,81	3,19	1,87
61	LU5	0,46	4,37	1,63	1,81
62	LU6	0,68	2,96	3,04	1,93
63	LU7	0,46	4,40	1,60	1,81
64	LU9	0,47	4,26	1,74	1,84
65	LU10	0,18	10,85	-4,85	1,68
66	LE1	0,60	3,32	2,68	1,94
67	LE2	0,43	4,61	1,39	1,91
68	LE3	0,58	3,42	2,58	1,93
69	LE5	0,42	4,82	1,18	1,89
70	LE7	0,51	3,90	2,10	1,98
71	LE8	0,49	4,06	1,94	1,84

\*A mostra LE10 nos se continuo empregando a partir de aquí por incapacidade de preparar a concentración desexada.

## Anexo 2: Táboa do protocolo comercial da reacción para SYBR Green.

Compoñente	Volumen para unha reacción de 20 µL	Volumen para unha reacción de 10 µL	Concentración final
SsoAdvancedUniversal SYBR Green Supermix (2x)	10 µL	5 µL	1X
<i>Forward e Reverse primers</i>	Variable	Variable	250-500 nM cada un
ADN	Variable	Variable	Para ADNc: 100 ng-100 fg Para ADN Xenómico: 50 ng - 5 pg
Agua libre de nucleasas	Variable	Variable	-
<b>Volumen total da reacción mix</b>	<b>20 µL</b>	<b>10 µL</b>	<b>-</b>

## Anexo 3: cadro esquemático dunha placa de 96 pocillos para realización PCR-*real time*.

09-04-2024

PLATE TEMPLATE FOR LIVER PRIMER VALIDATION

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1X	1X	1/2	1/2	1/4	1/4	1/8	1/8	1/16	1/16	1/32	1/32
B	1/64	1/64	1/128	1/128	1/256	1/256	1X	1X	1/2	1/2	1/4	1/4
C	1/8	1/8	1/16	1/16	1/32	1/32	1/64	1/64	1/128	1/128	1/256	1/256
D	1X	1X	1/2	1/2	1/4	1/4	1/8	1/8	1/16	1/16	1/32	1/32
E	1/64	1/64	1/128	1/128	1/256	1/256	1X	1X	1/2	1/2	1/4	1/4
F	1/8	1/8	1/16	1/16	1/32	1/32	1/64	1/64	1/128	1/128	1/256	1/256
G	1X	1X	1/2	1/2	1/4	1/4	1/8	1/8	1/16	1/16	1/32	1/32
H	1/64	1/64	1/128	1/128	1/256	1/256						

HAMP
FERRO
TRANSF
FLC
FHC

**Anexo 4: Táboa esquemática de Excel para estudo das diferentes mostras cos cebadores dos xenes de estudo e dos *Housekeepings*.**

Mostra	CT (HAMP)	Mean 1	CT (B-actin)	Mean 2	Mean 1 - Mean 2
CO 1	19,24	19,20	20,15	20,16	-0,96
CO 1	19,16		20,18		
CO2	20,55	20,47	21,13	21,25	-0,78
CO 2	20,40		21,36		
CO3	19,03	18,99	20,81	20,78	-1,79
CO3	18,94		20,75		
CO4	20,52	20,55	21,13	21,09	-0,54
CO4	20,59		21,05		
CO5	20,47	20,54	20,72	20,88	-0,34
CO5	20,61		21,05		
CO6	20,91	20,85	21,73	21,68	-0,82
CO6	20,80		21,62		
CO7	19,44	19,43	19,93	19,98	-0,55
CO7	19,43		20,03		
LU 1	18,72	18,78	20,84	20,88	-2,10
LU 1	18,83		20,92		
LU2	19,52	19,39	20,77	20,74	-1,35
LU2	19,27		20,72		
LU3	21,20	21,19	20,31	20,43	0,75
LU3	21,17		20,55		
LU4	19,28	19,22	20,45	20,68	-1,46
LU4	19,17		20,92		
LU5	19,30	19,25	21,21	21,19	-1,93
LU5	19,21		21,17		
LU6	18,75	18,70	20,72	20,78	-2,07
LU6	18,65		20,83		
LU7	18,75	18,69	20,40	20,48	-1,79
LU7	18,64		20,57		
LU9	17,93	17,93	20,49	20,49	-2,57
LU9	17,92		20,50		
LU10	19,09	19,12	20,97	20,96	-1,85
LU10	19,15		20,96		