



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**DISEÑO E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS EN
BIOMEDICINA: POSIBLES AGONISTAS Y
ANTAGONISTAS DE LA HEPCIDINA**

Autor: Íñigo González Mazón

Director: Gabriel Moncalián Montes

Santander, Junio 2016

ÍNDICE

RESUMEN	2
1. METABOLISMO DEL HIERRO Y LA IMPORTANCIA DE SU ALMACENAJE	3
1.1 Papel y distribución del hierro	3
1.2 Proteínas con un papel fundamental en el mantenimiento del metabolismo del hierro...3	
1.2.1 Regulación general	3
1.2.2 Papel de la ferritina	4
1.2.3 Papel de la transferrina.....	4
2. PAPEL DE LA HEPCIDINA.....	5
2.1 Niveles de hepcidina.....	5
2.2 Hepcidina: regulador principal del metabolismo del hierro	6
2.4 Regulación de la expresión de hepcidina	8
3. FÁRMACOS FRENTE A LA HEPCIDINA	11
3.1 Agonistas de la hepcidina	11
3.1.1 Tmprss6	11
3.2 Antagonistas de la hepcidina	11
3.2.1 Inhibidores de la producción de hepcidina	11
4. APLICACIÓN DE LA INGENIERÍA DE PROTEÍNAS A LA HEPCIDINA	16
4.1 Estructura de la Hepcidina y la Ferroportina.	16
4.2 Antagonistas de la hepcidina.	19
4.2.1 Anticuerpos monoclonales	19
4.2.2 Nuevas propuestas	20
4.3 Agonistas de la hepcidina	22
4.3.1 “Mini-hepcidina”	22
4.3.2 Análogos de BMP6 y pequeñas moléculas activadoras de la vía STAT/SMAD.....	22
4.3.3 Nuevas propuestas	23
5. CONCLUSIONES.....	25
6. REFERENCIAS	26

RESUMEN

Los trastornos en el metabolismo del hierro pueden causar enfermedades tanto por defecto como por exceso del mismo en el organismo, no existiendo una cura actualmente para ninguno de ellos. Recientemente se ha descrito una proteína, la hepcidina, que es la encargada de regular la homeostasis de este metal, lo que abre todo un abanico de posibles terapias dirigidas contra esta diana. En este trabajo se hace un resumen de los nuevos fármacos que se han ido diseñando (aún no hay ninguno comercializado) y se proponen nuevas opciones terapéuticas utilizando la ingeniería de proteínas como herramienta para crear agonistas y antagonistas de la hepcidina.

ABSTRACT

The iron metabolism disorders can cause both iron overload and iron deficiency diseases, for which there is no cure at this moment. Recently a new protein, hepcidin, has been described, and its function is to regulate the homeostasis of this metal, which opens a new bunch of possible therapies against this target. In this work there is a summary of the new drugs which have been designed (none of them is comercialized yet) and new therapeutical options are proposed using the protein engineering as a tool to create both agonists and antagonists of the hepcidin.

1. METABOLISMO DEL HIERRO Y LA IMPORTANCIA DE SU ALMACENAJE

1.1 Papel y distribución del hierro

El hierro es un cofactor fundamental para una gran cantidad de enzimas involucradas en reacciones de oxidación-reducción (redox) debido a la posibilidad de existir en dos formas iónicas: ferroso (Fe^{+2}) y férrico (Fe^{+3}). Sin embargo, la capacidad redox del hierro puede llevar a la producción de radicales libres de oxígeno, dañinos a diferentes niveles celulares. Por esta razón, los niveles tisulares de hierro deben estar estrictamente regulados (Ganz, 2013).

La cantidad total de hierro en un adulto de 70Kg es, aproximadamente, de 4g, de los cuales dos tercios es el hierro contenido por los glóbulos rojos o eritrocitos y 300mg formando la mioglobina de los músculos. Cada segundo se producen más de dos millones de eritrocitos, lo que requiere un aporte diario de, al menos, 20-30mg de hierro. Por ello la mayoría del hierro en plasma se dirige a la médula ósea, donde se usa como materia prima en el proceso de eritropoyesis. Este hierro proviene principalmente del reciclaje de los senescentes eritrocitarios que llevan a cabo los macrófagos del sistema retículo-endotelial (en torno a 20mg/día) (Gudjoncik et al., 2014). Así, sobre todo encontramos cantidades significativas de hierro en los macrófagos (en torno a 600mg) y tan solo entre 1 y 2mg de hierro son obtenidos cada día de la absorción intestinal, lo cual tan solo sirve para reponer las pérdidas insensibles del mismo. El exceso de hierro es almacenado en el hígado. El principal problema que implica un déficit de hierro en nuestro organismo es la anemia, mientras que el síndrome más característico debido a la sobrecarga de hierro en el organismo es la hemocromatosis hereditaria (Vujic, 2014). La adquisición, transporte, utilización y almacenaje del hierro está estrechamente controlado para suplir las necesidades metabólicas y para prevenir el acúmulo excesivo del metal en las células.

1.2 Proteínas con un papel fundamental en el mantenimiento del metabolismo del hierro.

1.2.1 Regulación general

Varias proteínas como la transferrina, ferritina, hemosiderina, hepcidina y ferroportina juegan un papel crucial en la homeostasis del hierro. Como ya se ha señalado los macrófagos tienen un papel clave a la hora de ejecutar los eventos que implican cambios en los niveles séricos de hierro (Gammella et al., 2014). El principal lugar en el que tiene lugar la absorción del hierro es el intestino delgado, pero la mayoría del hierro se recicla por el sistema monocito-macrófago mediante la fagocitosis de los senescentes eritrocitarios. En el torrente sanguíneo, el hierro está normalmente unido a la transferrina (Tf) y la mayoría del hierro unido a Tf es utilizado para la eritropoyesis en la médula ósea (Gudjoncik et al., 2014). En el interior celular, el hierro es almacenado en las proteínas ferritina o hemosiderina. Por otro lado, el hierro es el único micronutriente conocido con una hormona que lo regula, la hepcidina. La hepcidina es principalmente sintetizada en el hígado. Es un regulador negativo y su producción aumenta con la sobrecarga de hierro y con la inflamación. El hierro intracelular es liberado a la circulación a través de la ferroportina (FPN). El hierro es donado a la Tf y reutilizado para la eritropoyesis medular. La hepcidina se une al exportador de hierro FPN y produce su degradación, inhibiendo de esta manera la absorción intestinal de hierro, su exportación celular y la liberación del mismo por el sistema retículo-endotelial (Munoz et al., 2011).

1.2.2 Papel de la ferritina

La ferritina es la proteína principal encargada del almacenamiento del hierro, y sus niveles en suero reflejan las reservas celulares de hierro y sirven como marcador clínico de dichas reservas. Hay un fuerte equilibrio entre el hierro unido a ferritina (Fe^{+3}) y las reservas de hierro lábil intracelular (Fe^{+2}), por lo que la ferritina impide la formación de radicales libres de oxígeno mediada por la reacción de Fenton (Alkhateeb & Connor, 2013). La reacción de Fenton es un proceso de oxidación avanzada en el cual se producen radicales altamente reactivos del hidroxilo ($OH\cdot$). Esto se hace en condiciones de ambiente ácido y con presión y temperatura ambiente, usando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que está catalizado con metales de transición, generalmente hierro. La reacción se aplica para el tratamiento efectivo de aguas residuales (Fig.1).

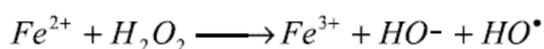


Fig. 1. Reacción de Fenton.

Existen dos subunidades distintas de Ferritina, tanto funcional como genéticamente: L-Ferritina y H-Ferritina (cadena ligera y pesada, respectivamente). La ferritina se encuentra en el citoplasma, núcleo y mitocondrias celulares. Aunque el hierro se almacene principalmente en el citoplasma, las mitocondrias son el principal usuario del hierro metabólicamente activo (MacKenzie et al., 2008). La regulación de la síntesis de ferritina mediada por hierro se debe a un mecanismo post-transcripcional mediante la unión de las proteínas IRP1 e IRP2 a los elementos responsables del hierro (IRE) localizados en el 5'UTR del mRNA de la ferritina. Tanto IRP1 como IRP2 se expresan en la mayoría de tejidos celulares. Además de la regulación de la síntesis de ferritina mediada por el hierro, el estrés oxidativo es capaz de modular la actividad de IRP1 e IRP2. Este proceso está a su vez regulado a nivel transcripcional por elementos de respuesta antioxidante (ARE) (Tsuij, 2005). El papel del óxido nítrico (NO) en la regulación del sistema IRP/IRE está bien establecido (Henze et al., 2004). El NO induce la expresión de FPN y está asociado con la activación de Nrf2 (Nairz et al., 2013). Dados los circuitos de regulación establecidos por entre la actividad de la sintetasa de óxido nítrico (NOS) y la homeostasis del hierro, se ha establecido la hipótesis de que el metabolismo del hierro y la biología del NO están interconectados.

1.2.3 Papel de la transferrina

Las células tienen receptores de transferrina (TfR1 o TfR2) que median en el metabolismo del hierro. El hierro es importado al interior celular a través de la endocitosis del complejo Fe^{+3} -Tf-TfRs (TfR1 y 2). Tf es una proteína monomérica de 76-81 kDa con dos sitios de unión al hierro. La Tf plasmática es un potente quelante, capaz de unirse a hierro de forma firme pero reversible. La quelación del hierro por la Tf sirve para mantener el Fe^{+3} de forma soluble y en un estado redox-inerte, previniendo la formación de radicales libres de oxígeno (Gkouvatsos et al., 2012). TfR1 (también conocido como CD71) es expresado en la mayoría de tejidos humanos. TfR2 es una proteína altamente homóloga (45% homología y 60% de similitud en su estructura primaria) a TfR1 (Anderson & Vulpe, 2009; Bayena et al., 2013; Koskenkorva-Frank et al., 2013) pero cuya expresión está restringida a los hepatocitos. Sirviendo como la principal puerta de entrada del hierro unido a Tf al interior celular, los TfR son unos receptores tipo II que se encuentran en la membrana celular. El complejo Tf-TfR es internalizado vía clathrin-coated pits y después metabolizada en el lisosoma (Daniels et al., 2012).

2. PAPEL DE LA HEPCIDINA

Hace una década, la hepcidina fue descubierta por tres laboratorios de forma independiente (Krause et al., 2000; Park et al., 2001; Pigeon et al., 2001). El laboratorio de Tomas Ganz fue quien le dio nombre a esta hormona, basándose en su alta expresión hepática (hep-) y a la actividad antimicrobiana que se le atribuía (-cidin). El descubrimiento de la hepcidina, hormona reguladora del hierro, seguido del esclarecimiento de su mecanismo de acción, nos ha conducido a un mejor entendimiento de la fisiopatología de enfermedades debidas a trastornos del metabolismo del hierro (Munoz-Bravo et al., 2013; Waldvogel-Abramowski et al., 2014) y nos ofrece nuevas posibilidades diagnósticas y terapéuticas.

La hepcidina es un péptido secretado principalmente por los hepatocitos (además de por los macrófagos, adipocitos, cardiomiocitos y enterocitos). Su receptor es la FPN (el único exportador de hierro conocido), a la cual se une induciendo su degradación, lo que inhibe el aflujo de hierro proveniente de los enterocitos intestinales (encargados de la absorción intestinal de hierro), macrófagos y hepatocitos al torrente sanguíneo (Ganz & Nemeth, 2012). La expresión de la hepcidina está regulada positivamente por las concentraciones plasmáticas de hierro. Aunque el mecanismo subyacente de la expresión de hepcidina mediada por hierro no ha sido del todo clarificado se han identificado una serie de proteínas que participan en esta función.

2.1 Niveles de hepcidina

Hasta la fecha, las concentraciones del biomarcador hepcidina tan solo habían sido medidas en muestras pequeñas de voluntarios y pacientes sanos. En un estudio reciente se tomó una muestra poblacional bien fenotipada y de gran tamaño (n=2998) y se midieron las concentraciones de hepcidina en función del sexo y de la edad. Mientras que los hombres mantenían unos niveles estables de hepcidina a lo largo de los años, las mujeres postmenopáusicas tenían unos niveles de hepcidina significativamente mayores con respecto a las premenopáusicas. La concentración media de hepcidina sérica en hombres era de 7.8 nM, mientras que en las mujeres era de 4.1 nM en las menores de 55 años y de 8.5 nM para las de 55 años o más (Galesloot et al., 2011). Aunque actualmente no se dispone de una evidencia suficiente para afirmar la existencia de variaciones circadianas en los niveles séricos de hepcidina, se piensa que dichas variaciones sí que existen y que pueden ser secundarias a la ingesta de hierro durante el día. La ferritina sérica ha demostrado ser el marcador más estrechamente relacionado con la concentración de hepcidina (Ashby et al., 2009). Se ha visto que la hepcidina y la razón hepcidina/ferritina (refleja la expresión de hepcidina en función de las reservas de hierro) están fuertemente asociadas a la presencia de placas ateroscleróticas en mujeres postmenopáusicas (Galesoot et al., 2014). Se ha hipotetizado que altas concentraciones de hepcidina podrían aumentar el riesgo cardiovascular por el enlentecimiento o impedimento de la movilización del hierro desde los macrófagos.

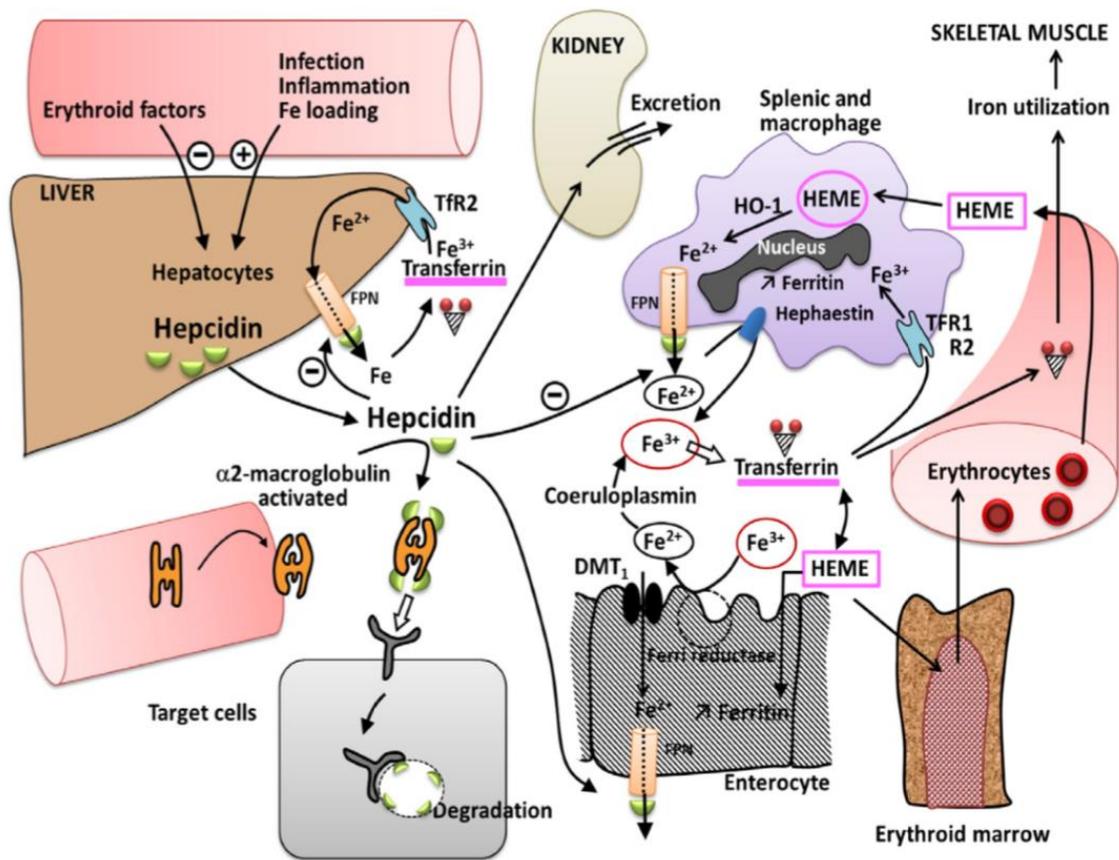


Fig. 2. Regulación del hierro sistémico y de la expresión de hepcidina. Los enterocitos incorporan el hierro mediante el transportador 1 de metal divalente (DMT1) localizado en su membrana apical junto a la ferri-reductasa, encargada de reducir el Fe⁺³ en Fe⁺². La hepcidina hepática se encarga de regular el aflujo de hierro a la circulación desde las células a través de la regulación de la ferroportina (FPN). La síntesis y secreción de hepcidina por los hepatocitos está influenciada tanto por las concentraciones de hierro como por procesos infecciosos o inflamatorios. La hepcidina se une a la glicoproteína plasmática activada α2-macroglobulina (α2M). Tanto los macrófagos como el bazo reconocen los eritrocitos dañados o sus senescentes y los fagocitan y digieren para obtener hierro y el grupo hemo. El grupo hemo a su vez es degradado por la acción de la hemo oxigenasa-1 (HO-1) para obtener hierro. Los macrófagos exportan Fe⁺² vía FPN, en un proceso apareado a la re-oxidación de Fe⁺² a Fe⁺³, el cual se une posteriormente a la transferrina (Tf). En la circulación, el hierro está en su mayor parte unido a la Tf. La Tf tiene receptores (TfR) que median en el metabolismo del hierro.

2.2 Hepcidina: regulador principal del metabolismo del hierro

Cuando las reservas de hierro son adecuadas o altas, el hígado produce hepcidina, que llega al intestino delgado. Las moléculas de FPN son expresadas en la membrana basolateral de los enterocitos, y transportan el hierro de su interior a la Tf plasmática. La hepcidina produce la internalización de la FPN, bloqueando el paso de hierro de los enterocitos y de los macrófagos al plasma. Los macrófagos exportan Fe⁺² desde su membrana plasmática vía FPN, en un proceso apareado con la re-oxidación de Fe⁺² a Fe⁺³ por la ceruloplasmina seguido de la unión del hierro férrico a la Tf. La Tf mantiene el hierro férrico en un estado redox-interte y lo libera en los tejidos.

Como se ha comentado previamente, el hierro entra en la célula desde el torrente sanguíneo formando un complejo con la Tf, que se une a sus receptores TfR1 y 2, a lo que sucede una endocitosis mediada por receptor. En condiciones fisiológicas, la Tf plasmática está hiposaturada (en torno a un 30%) y dispone de una muy alta capacidad de unión al hierro.

Diferentes estudios han revelado que la expresión del eje hepcidina-FPN está regulado por diferentes factores (endógenos y exógenos). A nivel molecular, las vías implicadas en esta regulación no son bien conocidas. El efecto de la vitamina D en esta unión sugiere que niveles bajos de esta vitamina podría ser un factor contribuyente a la anemia de trastornos crónicos (CKD), que se caracteriza por hipovitaminosis D. Un estudio reciente ha demostrado que la vitamina D es un potente regulador de la hepcidina tanto en hepatocitos como en monocitos (Bacchetta et al., 2014). En condiciones de déficit de vitamina D un aumento en la síntesis de hepcidina por los hepatocitos podría aumentar las concentraciones intracelulares y sistémicas de hepcidina con la consiguiente disminución en la expresión de FPN en dichas células. La supresión transcripcional directa de la expresión del gen de la hepcidina (HAMP) mediada por la unión de 1,25-dihidroxitamina D (forma activa de la vitamina) a su receptor causa una disminución en los niveles de mRNA de la hepcidina.

Estudios han demostrado una disminución en la expresión de la hepcidina en respuesta a la hipoxia. Sin embargo, la relevancia fisiológica de la hipoxia y su impacto en la regulación de la hepcidina es aún incierta y existe cierto conflicto al respecto. *In vivo*, la hipoxia podría también suprimir la hepcidina de forma indirecta a través de la eritropoyesis. El factor inducible de hipoxia (HIF) podría, sin embargo, contribuir indirectamente a la supresión de la hepcidina a través de la degradación de la hemojuvelina (Silvestri et al., 2008). De hecho, HIF1 α y 2 α han demostrado aumentar la absorción intestinal de hierro, la adquisición de hierro por parte de los precursores eritroides y suprimir la producción de hepcidina mediante un adecuado aporte de hierro para producir la eritropoyesis (Evstatiev & Gasche, 2012; Palaneeswari et al., 2013). Se han investigado las modificaciones inducidas por exposición aguda y crónica a la hipoxia hipobárica en los niveles de hierro sérico, EPO, IL-6, y hepcidina. Los niveles de hepcidina disminuyeron 40 horas después de la exposición a hipoxia a 3400m y alcanzaron su nivel mínimo a los 5400m. Esta caída estaba asociada con la rápida disminución de los niveles séricos de ferritina. La fuerte correlación entre la ferritina sérica y la hepcidina durante el estudio indica que el hierro en sí mismo o la utilización de hierro en función de la hipoxia podría regular negativamente la hepcidina (Piperno et al., 2011).

El retículo endoplasmático (ER) podría jugar un papel en la regulación de la hepcidina en respuesta a la inflamación. La respuesta a la inflamación aguda se ha relacionado con el estrés del ER, un estado que se asocia con la disrupción de la homeostasis del propio ER y la acumulación de proteínas no plegadas o plegadas erróneamente en el ER. La regulación de la hepcidina por el estrés del ER parece unir la respuesta celular involucrada en el control de calidad de proteínas con la inmunidad innata y la homeostasis del hierro. Aparentemente, la hepcidina reacciona no solo a estímulos extracelulares como fluctuaciones del hierro plasmático y citoquinas, sino también a señales de estrés del interior celular (Vecchi et al., 2009; Oliveira et al., 2011).

Con respecto a los mediadores endógenos: el monóxido de carbono (CO) y el NO parecen jugar un rol en esta regulación. El CO suprime la expresión de la hepcidina provocada por la IL-6 y los agentes de estrés del ER mediante la inhibición de la fosforilación de STAT-3 (signal transducer and activator of transcription) y la maduración de CREBH (cyclic AMP response element-binding protein-H). La actividad anti-inflamatoria del CO está implicada además en el estrés del ER (Rochette et al., 2013).

Con respecto al NO, se ha hipotetizado que la homeostasis del hierro y la biología del NO están interconectados (ver punto previo: Papel de la ferritina). Varios estudios indican un efecto potencialmente sinérgico entre NO y H₂S en el control de varias respuestas biológicas de la función vascular. Es interesante remarcar que las funciones citoprotectoras de concentraciones bajas de H₂S son comparables a las del NO. El NO y el hidrógeno pueden reaccionar con metaloproteínas como los grupos hierro-sulfuro (Kolluru et al., 2013; Yin et al., 2013).

2.4 Regulación de la expresión de hepcidina (Fig. 3)

La expresión de la hepcidina es dependiente de cascadas de señalización opuestas: los efectos combinados de varias vías determinan sus niveles. Los factores sistémicos que alteran la expresión de la hepcidina, como la anemia o la inflamación, están bien establecidos. Sin embargo, el mecanismo por el cual la hepcidina se regula a nivel molecular continúa sin estar del todo claro.

HFE, el gen mutado en la forma más común de la hemocromatosis (enfermedad con una sobrecarga sistémica de hierro) juega un papel importante en la monitorización del estado del hierro del organismo y de desencadenar una respuesta adaptativa por parte de la hepcidina en función de dicho estado. La proteína HFE interacciona con TfR1 en un sitio que se superpone con el de unión a la Tf. Como se ha mencionado previamente, la inflamación estimula la expresión de hepcidina, lo que implica un estado de ferropenia asociado a episodios inflamatorios. Entre las numerosas citoquinas pro-inflamatorias que han demostrado aumentar la expresión de la hepcidina, la IL-6 ha sido la más estudiada. La IL-6 estimula la transcripción de hepcidina a través de la vía de señalización STAT-3. Varios derivados microbiológicos que actúan como ligandos de TLR (Toll-like receptor) pueden inducir la expresión de hepcidina, y probablemente lo hagan mediante la inducción de IL-6 (Darshan & Anderson, 2009). El factor regulador de hepcidina más recientemente descrito es la vía BMP (bone morphogenetic protein)/SMAD (Sma and Mad). También se ha demostrado que la dorsomorfina, un inhibidor selectivo de la fosforilación de BMP/SMAD, bloquea la inducción de hepcidina mediada por IL-6 (Yu et al., 2008). Parece que la regulación coordinada de la expresión de hepcidina por BMP e IL-6 podría involucrar una comunicación cruzada a nivel de la señalización de traducción. Estos efectos están influenciados por el microambiente celular. BMP6 es el regulador endógeno específico de la hepcidina (Camaschella, 2009). Mutaciones en los genes que codifican BMP6, su co-receptor HJV y la molécula de señalización intracelular SMAD4, están asociadas con una supresión de la expresión de hepcidina. Esto está asociado a sobrecarga tisular de hierro.

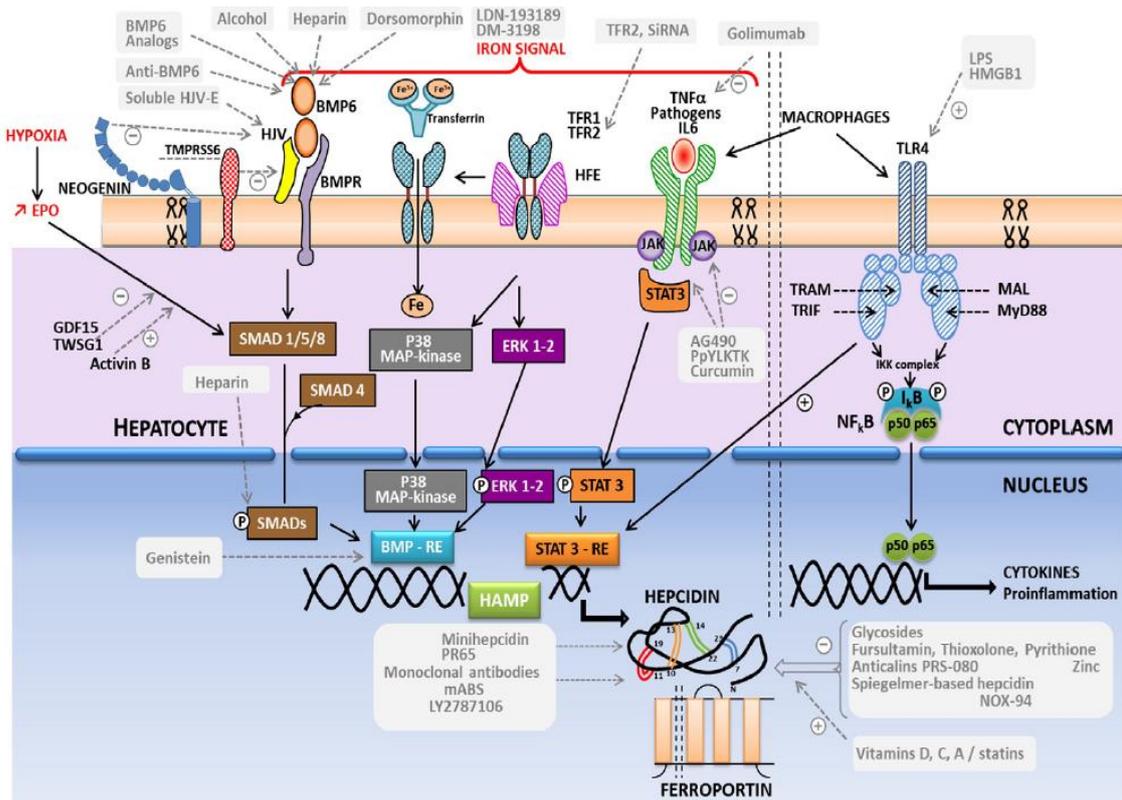


Fig. 3. Expresión de la hepcidina en el hepatocito y en el macrófago en respuesta a las señales del hierro. La expresión del gen de la hepcidina está regulada positivamente por la inflamación y el hierro a través de las vías JAK/STAT y BMP/SMAD respectivamente. La señal BMP-6 actúa a través de su receptor (BMPR), y está modulada por la hemojuvelina (HJV). Tmprss6 rompe la HJV unida a la membrana. Los BMPs también pueden actuar de forma independiente a la vía SMAD, principalmente a través de las MAP-quinasas. La dorsomorfina inhibe la señalización BMP a través de la vía SMAD. Los complejos SMAD se unen a elementos de respuesta de BMP (BMP-Res). El TNF, patógenos y la IL-6 estimulan la síntesis de hepcidina vía STAT-3. El P38, las MAP-quinasas y las vías ERK 1 y 2 son activadas en respuesta a señales del hierro. La Tf se une al Tfr1 en la superficie celular y el complejo es endocitado. HFE es una proteína que compete con la Tf en la unión a Tfr1. La señalización por parte de los TLR requiere interacciones de ciertos dominios del receptor con proteínas adaptativas. La expresión de hepcidina en los macrófagos está principalmente regulada por TLR4 asociado a proteínas adaptativas (TRAM, TRIF, MAL, MyD88). La expresión de mRNA de hepcidina en macrófagos inducida por LPS o HMGB1 depende de NFκB. Por simplificar la figura no se han incluido todos los factores reguladores descritos.

Actualmente se reconoce que la cascada de señalización BMP6-HJV-SMAD juega un papel principal en la regulación de la hepcidina y en la homeostasis del hierro (Babitt & Lin, 2010). La estimulación por BMP6 y/o hierro induce un incremento en la actividad de la vía BMP6-HJV-SMAD, posiblemente a través de un mecanismo que incluye a HFE y Tfr2, lo que lleva a los complejos SMAD a unirse a los BMP-Res en el promotor de la hepcidina y la estimulación de su transcripción. Los BMPs actúan uniéndose a complejos de dos receptores tipo I y dos receptores tipo II (BMPR-I y BMPR-II) y modulan la expresión de genes diana a través de diferentes vías de señalización. La señalización a través de proteínas SMAD está ahora bien caracterizada. Los dominios quinasa constitutivamente activos de los receptores tipo II fosforilan los receptores tipo I, y estos activan la vía SMAD a través de la fosforilación de receptores SMADs (SMAD1, SMAD5 y SMAD8). Estos se unen a co-SMADs (SMAD4) para formar un complejo heteromérico que se dirige al núcleo celular y estimula la expresión de un

amplio rango de genes diana, incluyendo el gen que codifica la hepcidina (Anderson & Darshan, 2008).

Existen importantes interacciones entre las diferentes vías, y también se ha descrito la involucración de otros miembros de la red regulatoria, como el GDF-15 (growth differentiation factor-15). La expresión de GDF-15 está asociada con el estrés celular o la apoptosis en varios tejidos. GDF-15 se expresa en los eritroblastos maduros en el contexto de enfermedades debidas a una eritropoyesis ineficaz como las talasemias. Se ha demostrado que GDF-15 suprime la secreción de hepcidina (Tanno et al., 2007, 2010). La expresión eritroblástica de una segunda molécula llamada TWSG1 (twisted gastrulation gene 1) se ha estudiado como un potencial regulador eritroide de hepcidina. TWSG1 interfiere con la expresión de hepcidina mediada por BMP y podría actuar junto con GDF-15 para desregular la homeostasis del hierro en la talasemia. Las vías de señalización SMAD están implicadas en las acciones celulares de GDF-15 Y TWSG1 (Tanno et al., 2009).

Como ya se ha dicho, la expresión de hepcidina en los macrófagos está regulada principalmente por los receptores TLR. La regulación autocrina de acúmulo de hierro en los macrófagos por la hepcidina podría afectar a la producción de citoquinas pro-inflamatorias. La expresión de hepcidina mediada por TLR-2 y TLR-4 fue completamente abolida en macrófagos con MyD88 (myeloid differentiation factor 88) $-/-$, sugiriendo que la señalización de MyD88 es necesaria para la inducción de hepcidina mediada por TLR (Layoun & Santos, 2012).

Todas las observaciones clínicas señalan que el estrés oxidativo podría estar involucrado en la señalización mediada por IL-6. Durante la inflamación, las células están expuestas a concentraciones altas de superóxido y H_2O_2 de forma constante. Esta situación requiere una estrecha regulación de la homeostasis del hierro para prevenir daño tisular. En los neutrófilos y los macrófagos, NOX2 (membrane-associated NADPH oxidase) genera superóxido, el cual es convertido a H_2O_2 por SODs (Breachard & Tschirhart, 2008). Recientemente se ha demostrado que concentraciones muy bajas de H_2O_2 eran suficientes para potenciar la regulación de hepcidina en células de hepatoma y en hepatocitos primarios, ya que H_2O_2 actúa sinérgicamente con otros inductores de hepcidina, como IL-6. El efecto de H_2O_2 en la hepcidina está principalmente mediado por la vía STAT3, que es la vía clásica inflamatoria de la regulación de la hepcidina (Millonig et al., 2012).

3. FÁRMACOS FRENTE A LA HEPCIDINA

3.1 Agonistas de la hepcidina

3.1.1 TMPRSS6

También conocida como matriptasa-2, es una serín proteasa de membrana tipo II, sintetizada en el hígado. La proteína humana de 811 aminoácidos es sintetizada como una proenzima inactiva que se autoactiva por escisión proteolítica.

Se ha demostrado que la expresión de su mRNA es inducida por la eritropoyetina (EPO), la hipoxia y por el descenso agudo de sus niveles en suero. La hemojuvelina (HJV) fue el primer sustrato exógeno biológicamente relevante de TMPRSS6 en ser identificado (Lee, 2009). TMPRSS6 está mutado en la anemia ferropénica refractaria a hierro. Inhibe la expresión de hepcidina bloqueando la señalización BMP/SMAD. Estas mutaciones han demostrado, tanto en animales como en humanos, producir un aumento de la expresión de hepcidina así como una disminución de la absorción de hierro, conduciendo a una anemia ferropénica (Delbini et al., 2010). Estudios que han identificado asociaciones entre variantes de TMPRSS6 y diferentes parámetros hematológicos sugieren que esta proteína juega un papel esencial en el control de la homeostasis del hierro y la eritropoyesis (Cau et al., 2013). Se ha demostrado que el tratamiento de modelos de ratones con b-talasemia con TMPRSS6 siRNA formulado en nanopartículas lipídicas aumenta la expresión de hepcidina y disminuye la sobrecarga de hierro (Schmidt et al., 2013).

3.2 Antagonistas de la hepcidina

3.2.1 Inhibidores de la producción de hepcidina

3.2.1.1 Bloqueo vía BMP6-HJV-SMAD.

Dado que esta vía juega un papel clave en estimular la transcripción de hepcidina, el secuestro de ligandos BMP podría disminuir su expresión. Es conocido que la heparina, glucosaminoglicano utilizado como anticoagulante, se une a los BMPs. El tratamiento de ratones con dosis farmacológicas de heparina ha demostrado inhibir la expresión hepática de hepcidina así como la fosforilación de SMAD, reducir las concentraciones esplénicas de hierro y aumentar su concentración en suero (Poli et al., 2011). Las heparinas son inhibidores eficientes de hepcidina tanto in vitro como in vivo, pero su actividad anticoagulante limita su uso terapéutico. Han sido estudiadas recientemente heparinas no anticoagulantes, producidas mediante N-acetilación y oxidación/reducción, lo cual abole su afinidad por unirse a la trombina. Estos compuestos no anticoagulantes bloquean la señalización BMP/SMAD sin evidencia de efectos adversos in vivo (Poli et al., 2014). La inhibición de la señalización del receptor de BMP tipo I por pequeñas moléculas inhibitorias también ha sido eficaz en el tratamiento de ATC. A través del estudio de relación estructura-actividad de derivados de dorsomorfina se han desarrollado componentes optimizados (LDN-193189 ó DM-3189) con mayor actividad y especificidad por los receptores de BMP tipo I (Cuny et al., 2008). LDN-

LDN-193189 disminuye los niveles de hepcidina, moviliza las reservas esplénicas de hierro, aumenta el hierro sérico y la incorporación de hierro a los reticulocitos (Sun et al., 2013).

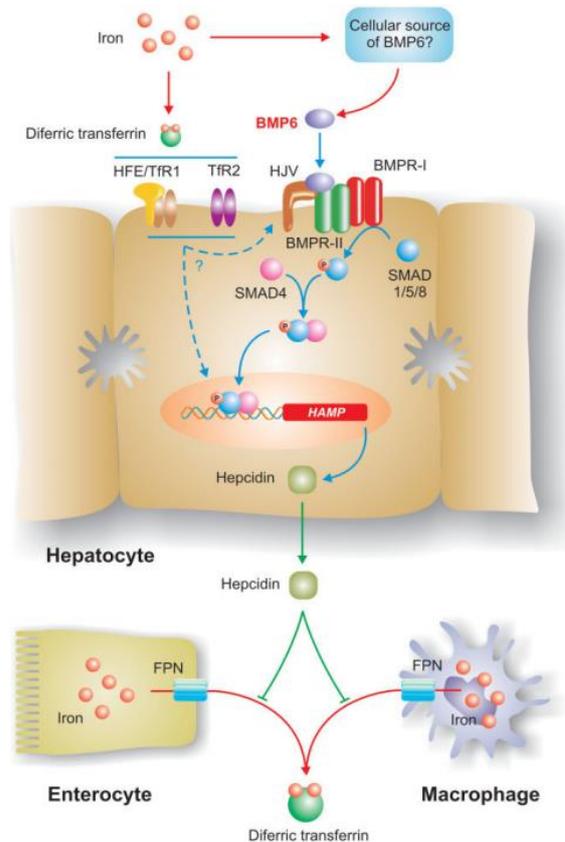


Fig. 4. Regulación de la producción de hepcidina por la vía BMP6-HJV-SMAD. El BMP6 responde al aumento de los niveles de hierro en plasma, uniéndose a su receptor y al correceptor HJV. Esto estimula la fosforilación de SMAD1, SMAD5 y SMAD8, lo que produce la unión con el co-SMAD (SMAD4). Este complejo se dirige al núcleo de la célula donde estimula la transcripción del gen que codifica la hepcidina, *HAMP*.

Con respecto a estos compuestos derivados de dorsomorfinas, tienen varios efectos a nivel de otras dianas. Se han desarrollado programas con el objetivo de identificar moduladores selectivos. El reto consiste en la síntesis de inhibidores selectivos, potentes y con buena biodisponibilidad de las quinasas del receptor de BMP tipo I.

Se ha demostrado en macrófagos evidencia de interrelación entre el colesterol y el metabolismo del hierro. Los datos sugieren que la reducción de los niveles de hierro libre intracelular en macrófagos mediante el aumento de la expresión de FPN en dichas células puede ser una estrategia prometedora para aumentar la expresión de transportadores de colesterol (Saeed et al., 2012). Se ha estudiado la eficacia de LDN-193189 con respecto a este efecto. Los niveles de hierro sérico son significativamente mayores después del tratamiento con dicha molécula. Los macrófagos peritoneales aislados después de este tratamiento han demostrado reducir el hierro intracelular y la producción de peróxido de hidrógeno. Para comprobar el efecto en la aterosclerosis, se han tratado con LDN-193189 ratones ApoE^{-/-} sometidos a una dieta rica en colesterol. Se encontraron reducciones significativas de las placas de ateroma, junto con aumento de la inmunoreactividad de ABCA1 en las regiones de placas ricas en macrófagos. Esto sugiere que LDN-193189 aumenta la expresión de ABCA1 en macrófagos de las placas de ateroma, limitando la progresión de dichas placas.

La proteína soluble de fusión HJV-Fc (sHJV.Fc) es otro agente que impide la interacción entre BMPs y sus receptores. sHJV actúa uniéndose a BMP6 lo que disminuye la señalización SMAD y por tanto, la expresión de hepcidina. sHJV es un fragmento soluble del BMP unido a membrana

que actúa como correceptor de HJV, teniendo la forma soluble y la forma de membrana efectos opuestos en la expresión de hepcidina. En este contexto, la inhibición farmacológica de hepcidina por esta vía resulta en la movilización de hierro desde el sistema retículo-endotelial, estimulación de la eritropoyesis y corrección de la anemia (Theurl et al., 2011).

El consumo de alcohol también ha sido asociado con cambios en la homeostasis del hierro. La anemia y la deficiencia de hierro pueden deberse a la pérdida por sangrado intestinal consecuencia del abuso de alcohol. Se ha demostrado que la señalización mediada por hierro está involucrada en la patogénesis de la hepatopatía alcohólica (Harrison-Findik, 2009). El mecanismo involucrado en esto es la inhibición de la vía BMP-SMAD, según estudios recientes. La inhibición del receptor de BMP y señalización por alcohol podrían involucrar diferentes procesos como hipoxia hepática y bloqueo de la unión de SMADs al promotor de la hepcidina (Gerjevic et al., 2012).

3.2.2.2 Agentes anti-citoquina.

Dado que la expresión de hepcidina es fuertemente inducida por IL-6/STAT3, esta sería otra posible vía diana. El beneficio de estos agentes usados para tratar enfermedades inflamatorias podría deberse a la reducción de expresión de hepcidina. EL tratamiento con anticuerpos anti-TNF α (golimumab) en pacientes con artritis reumatoides está asociado con un descenso continuo de los niveles de hepcidina (Doyle et al., 2013).

Ir contra la eritropoyesis podría ser otra estrategia farmacológica. Una sola inyección de EPO en humanos voluntarios ha demostrado producir una rápida disminución de los niveles séricos de hepcidina (Ashby et al., 2010). Agentes estimuladores de la eritropoyesis, como los inhibidores de la proil hidroxilasa han sido probados en ensayos clínicos. El aumento de producción de EPO fue capaz de disminuir la hepcidina. Sin embargo, estos efectos biológicos se asociaron con importantes efectos no deseados (Schwoebel et al., 2013).

3.2.1.3 Inhibidores de STAT3.

El alto nivel de expresión de hepcidina ligado a la vía STAT3 a llevo a probar la viabilidad de inhibidores de dicha vía. El tratamiento con pequeñas moléculas inhibitoras de STAT3 como AG490 y PpYLKTK ha demostrado abolir la expresión de la hepcidina en ratones. AG490 inhibe la fosforilación de STAT3 mediada por JAK2, mientras que PpYLKTK impide la dimerización que se produce cuando STAT3 se fosforila, lo cual es necesario para la unión a los genes diana (Faith et al., 2010). En la anemia, AG490 podría ser una posible estrategia para atenuar las acciones biológicas mediadas por hepcidina. Otro inhibidor de STAT3 es la curcumina, la cual se ha propuesto como adyuvante terapéutico en la inflamación, y ha quedado demostrada su potencial actividad como quelante de hierro (Aggarwal & Shishodia, 2006). Otro modo de inhibir la producción de hepcidina está asociada con el bloqueo de anticuerpos contra IL-6. Esta estrategia ha resultado en una disminución de los efectos de la hepcidina. Siltuximab (previamente conocido como CNTO 328) es un AcMo (IgGk) quimérico que se une y neutraliza la IL-6 humana con alta afinidad y especificidad, teniendo un potencial efecto terapéutico (Van Rhee et al., 2010).

3.2.1.4 Compuestos farmacológicos con propiedades antagonistas de la hepcidina.

Uno de los grupos de estos compuestos lo forman los glicosados cardiacos. Concentraciones nanomolares de glicosados cardiacos previenen la internalización de la FPN. Estas concentraciones son mucho más bajas que las necesarias para producir efectos adversos (Riganti et al., 2011).

Pequeñas moléculas identificadas como antagonistas de la hepcidina, véase la furustamina, tioxolona y el cinc piritiona, los cuales están aprobados por la FDA, impiden la interacción entre la hepcidina y la FPN. Se piensa que el mecanismo por el que la furustamina bloquea dicha interacción podría ser el antagonizar la ubiquitinación de la FPN (Fung et al., 2013).

Avances recientes en el conocimiento del metabolismo del hierro nos hacen pensar que la producción de hepcidina podría estar relacionada con el medio vitamínico. Por un lado, en situaciones de déficit de vitamina D se ha observado aumento de síntesis de hepcidina. Por otro, la biodisponibilidad del hierro parece estar regulada por vitaminas antioxidantes. En numerosos estudios se han observado correlaciones entre productos de oxidación y biomarcadores del metabolismo del hierro (Cottin et al., 1998; de Valk & Marx, 1999). Se ha propuesto que la hepcidina es capaz de proteger los tejidos mediante la inhibición de la peroxidación de lípidos a través de procesos indirectos que incluyen el metabolismo del hierro. La relación entre un antioxidante como es la vitamina C y la expresión de hepcidina no está clara. Sin embargo, se ha observado que en pacientes con fallo renal crónico el tratamiento con altas dosis de EPO o vitamina C puede corregir la deficiencia funcional de hierro (Pinto et al., 2008).

Hay evidencias de que en la línea germinal de carcinoma hepático humano (HepG2) la vitamina C inhibe la expresión de hepcidina de forma directa (Chiu et al., 2012). Con respecto al efecto del déficit de vitamina A en el estado del hierro, se ha demostrado que metabolitos de la vitamina A afectan a la regulación de la síntesis y al catabolismo de proteínas involucradas en el metabolismo del hierro. El déficit de vitamina A aumenta los niveles del mRNA de la hepcidina (Schroeder et al., 2007; Arruda et al., 2009).

Se piensa que las estatinas podrían tener un impacto positivo en la respuesta a los agentes estimulantes de eritropoyetina (ESAs). Un estudio reciente ha demostrado que la simvastatina suprime de forma significativa la expresión del mRNA de la hepcidina en células HepG2 (Chang et al., 2013). Las estatinas, que inhiben el 3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A reductasa, no solo disminuyen los niveles lipídicos, sino que también tienen varios efectos pleiotrópicos. De hecho, los mecanismos implicados en los cambios que producen en la expresión de la hepcidina aún siguen sin estar claros (Ha et al., 2009). El tratamiento con estatinas podría mejorar la respuesta a ESAs en pacientes con enfermedad renal terminal. Existen estudios que sugieren que las estatinas aumentan la respuesta a eritropoyesis mediante su efecto sobre la hepcidina y el metabolismo del hierro, independientemente de la EPO (Chang et al., 2013). Una posible interpretación de estos resultados son las propiedades antioxidantes de las estatinas (Sicard et al., 2007, 2008).

Inhibitors	Target	Reference
BMPs/BMPr complex		
sHJV-Fc	Inhibitors of BMPs/SMAD pathway	Babitt et al. (2007), Andriopoulos et al. (2009), Theurl et al. (2011), Wang et al. (2012)
LDN-193189	Inhibitor of phosphorylation of BMPs receptor type I	Cuny et al. (2008), Steinbicker et al. (2011), Theurl et al. (2011), Wang et al. (2012), Sun et al. (2013), Saeed et al. (2012)
siHJV, siTfR2	Degradation of HJV or TfR2 mRNA	Akinc et al. (2011)
Anti-BMP6 antibody	Sequestration of BMP6	Andriopoulos et al. (2009), Corradini et al. (2010), Wang et al. (2012)
Heparin	Inhibitors of BMPs/SMAD pathway	Poli et al. (2011, 2014)
IL6/STAT3 axis		
Anti-IL6r (Tocilizumab)	Sequestration of IL6 receptor	Song et al. (2010), Hashizume et al. (2010)
Anti-IL6 (Siltuximab)	Sequestration of IL6	Schipperus et al. (2009), van Rhee et al. (2010), Kurzrock et al. (2013)
AG490	Inhibitor of STA3 phosphorylation	Fatih et al. (2010), Zhang et al. (2011)
PpYLKTK	Disruptor of STAT3 dimerization	Fatih et al. (2010)
Anti-hepcidin agents		
siHep	Degradation of hepcidin mRNA	Pharmaceuticals, A. ALN-HPN: refractory anemia 2011; Xenon. Isis and Xenon collaborate to develop antisense drugs against hemojuvelin and hepcidin 2010.
Anti-hepcidin antibody	Sequestration of hepcidin protein	Sasu et al. (2010)
Anticalin	Sequestration of hepcidin protein	Congress of the International Biolron Society (Biolron 2011) Vancouver, Canada. American Journal of Hematology 2011; 86:E48.
Spiegelmers	Sequestration of hepcidin protein	Schwoebel et al. (2013), Riecke et al. (2012), Van Eijk et al. (2013)
Alteration of hepcidin-ferroportin interaction		
anti-ferroportin antibodies	Interfering with hepcidin binding to ferroportin	Leung et al. (2012)
Fursultiamine	"Sequestration" of Cys326-HS on FPN heparin binding site	Fung et al. (2013)

Tabla 1. Resumen de los principales fármacos contra la hepcidina.

4. APLICACIÓN DE LA INGENIERÍA DE PROTEÍNAS A LA HEPCIDINA

La Ingeniería de Proteínas es una rama emergente de la ingeniería que aplica conocimientos de matemáticas, economía y biología molecular al diseño de proteínas. La ingeniería de proteínas opera de forma iterativa, siguiendo un proceso cíclico que alterna etapas en las que se planean y ejecutan los cambios a realizar con otras en las que se evalúa el resultado de los mismos.

Existen dos métodos para el diseño de proteínas: el diseño racional y la evolución dirigida.

En el diseño racional se introducen cambios en ciertos aminoácidos mediante mutagénesis dirigida, basados en la hipótesis que algunos cambios específicos causarán el efecto funcional buscado. Existen ocasiones que dichos cambios se dan combinado dominios o motivos estructurales de distintas proteínas, generando una proteína híbrida o quimera. Es un método sencillo y barato.

En la evolución dirigida se introducen mutaciones aleatorias en la proteína bajo estudio y se seleccionan solo aquellas variantes que presentan las propiedades deseadas.

La fase final o bioquímica del ciclo de diseño tiene el objetivo inmediato de purificación la proteína, como etapa previa para la resolución de su estructura tridimensional, ya que la determinación de la estructura de una proteína es la mejor herramienta disponible para explicar cómo ejerce su función. La estrecha vinculación existente entre la estructura de una proteína y su función hace imprescindible el disponer de una sólida información estructural para acometer con cierta garantía de éxito cualquier planteamiento de ingeniería de proteínas.

Es frecuente que los investigadores apliquen ambas técnicas en el diseño de una proteína dada, primero se aplica el diseño racional y posteriormente se somete al producto a evolución dirigida, siguiendo el ciclo de diseño.

4.1 Estructura de la Hecpidina y la Ferroportina.

Antes de empezar a hablar de las distintas formas en las que podemos antagonizar o favorecer la actividad de la hepcidina, es interesante, para su mejor comprensión, conocer la estructura de la misma, de su receptor y cómo se produce la unión entre ambas, así como las consecuencias de dicha unión.

Como se muestra en la figura 4, La hepcidina es un péptido formado por 25 aminoácidos (2.7 kDa) que forman una horquilla simple estabilizada por cuatro puentes disulfuro que se forman entre sus ocho residuos Cys (Ganz, 2005). Estudios de RMN han revelado un plegamiento compacto con una lámina β y una horquilla β , ya mencionada (Hunter et al., 2005). Consta además de un extremo N-terminal formado por seis aminoácidos (DTHPFI) el cual ha demostrado ser necesario, aunque no suficiente, para la unión de la hepcidina a su receptor (Nemeth et al., 2005).

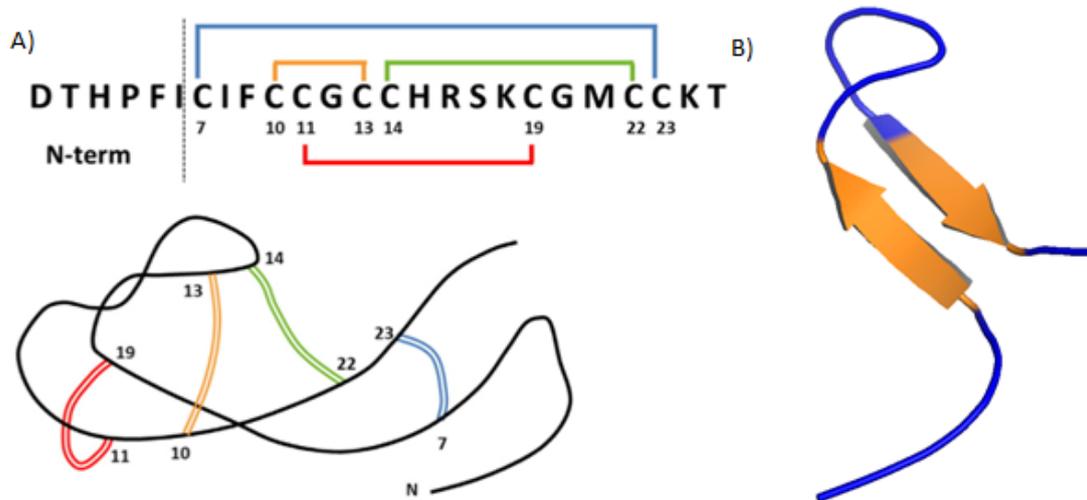


Fig. 5. A) Hepcidina: la secuencia de aminoácidos y su estructura. Contiene cuatro uniones disulfuro. El extremo N-terminal se une a la FPN. B) Estructura de la hepcidina (PDB:2kef) en PyMOL.

El receptor de la hepcidina es la ferroportina (FPN), una proteína dimérica transmembrana responsable de la salida del hierro intracelular al plasma (Nemeth et al., 2004b). Mutaciones en el gen de la FPN se asocian con enfermedades autosómicas dominantes que producen una sobrecarga de hierro (Detivaud et al., 2013). La hepcidina se une a un dominio altamente conservado de un bucle extracelular de la FPN. Esta interacción se identificó a partir de la observación de que mutaciones en la Cys326 del bucle implicaban una resistencia de la FPN a la unión de la hepcidina. Se piensa que el tiol libre de la Cys326 forma un puente disulfuro con alguno de los residuos de cisteína de la hepcidina (Clark et al., 2011). Tras la unión de la hepcidina a la FPN, el complejo Hepcidina/FPN es internalizado, la FPN es desfosforilada y posteriormente ubiquitinizada.

La unión de JAK2 a la FPN es altamente cooperativa, y es necesario que la hepcidina se una a los dos monómeros que forman la FPN para que JAK2 se una a la FPN (De Domenico et al., 2009). Una vez unida, JAK2 es autofosforilada y después fosforila la FPN, que se internaliza (De Domenico et al., 2009).

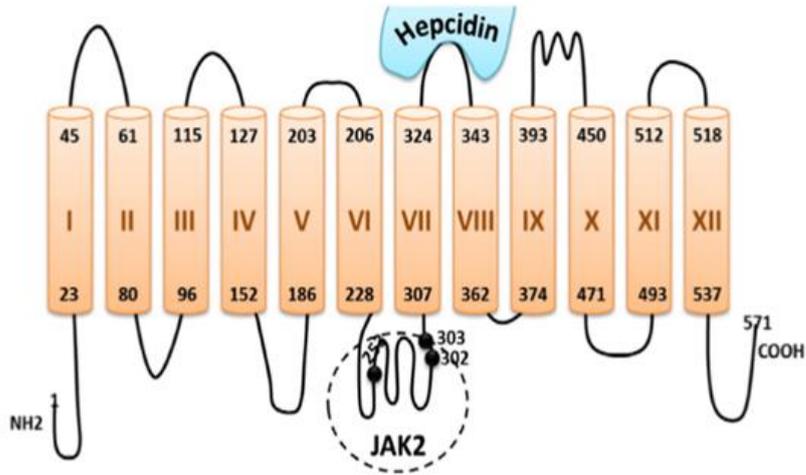


Fig. 6. Ferroportina humana y sus dominios funcionales (12 regiones transmembrana formadas por 21-23 aminoácidos. La hepcidina se une a un residuo del bucle extracelular de la ferroportina. La hepcidina ejerce su influencia en el metabolismo del hierro bloqueando su exportación del medio intracelular mediada por la ferroportina. Janus Kinasa 2 (JAK2) se une a un dominio citoplasmático de la hepcidina.

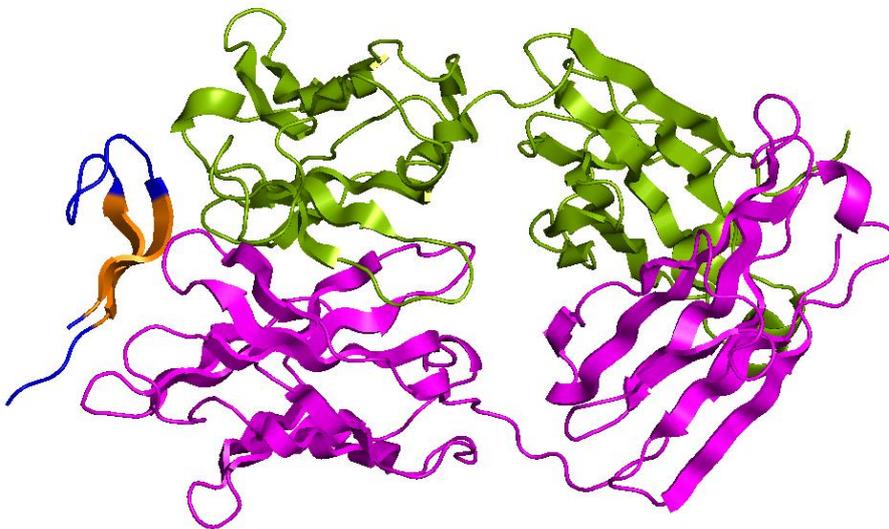


Fig. 7. Imagen obtenida de PyMOL (PDB:3h0t) en la que se ve la unión de la hepcidina unida a su receptor, la ferroportina.

4.2 Antagonistas de la hepcidina.

4.2.1 Anticuerpos monoclonales

4.2.1.1 Anticuerpos monoclonales anti-hepcidina

Se han desarrollado estrategias que neutralizan la actividad de la hepcidina a través de la unión directa a la misma de anticuerpos monoclonales (AcMo), proteínas diseñadas por ingeniería y “binders” basados en RNA. Se han creado anticuerpos de alta afinidad específicos para la hepcidina humana (hHepc). La supresión de del mRNA de la hepcidina o la neutralización mediada por AcMo ha sido capaz de contrarrestar la anemia inducida por inflamación (anemia por trastornos crónicos) en modelos de ratones (Sasu et al., 2010). La interferencia del RNA (RNAi) y oligonucleótidos antisentido silenciadores de genes que tienen como diana la transcripción o traducción de la hepcidina son otras aproximaciones a desarrollar de cara al tratamiento de la anemia de trastornos crónicos (ATC). Oligonucleótidos antisentido que antagonizan la traducción de la hepcidina o sus mediadores, como la HJV, están actualmente en diferentes escalones de investigación.

Se han descubierto marcadores de superficie como CD2, CD3, CD4, CD25 y CD52 expresados en linfocitos T, los cuales se han convertido en dianas terapéuticas específicas. AcMo anti CD52 son eficaces en la disminución del número de linfocitos a través de efectos citolíticos in vivo. Un estudio reciente tenía como objetivo estudiar el efecto terapéutico de estos AcMo anti CD52 en ratones con anemia por enfermedad inflamatoria intestinal. Los resultados indicaron que esta terapia podría mejorar dicha anemia (Wang et al., 2014). AcMo humanos o humanizados contra la hepcidina han sido desarrollados por las empresas “Lilly” (US Patent 7820163) y “Amgen” (US Patent Application 12/022515). Un AcMo humanizado contra la hepcidina está en la fase I de un ensayo clínico. Este estudio evaluará la seguridad de LY2787106 en pacientes con cáncer y anemia.

4.2.1.2 Ac monoclonal anti-BMP6 y oligonucleótidos antisentido

La terapia con AcMo anti-BMP6 es otra forma bloquear de forma específica la regulación de la hepcidina mediada por BMP6. La administración de AcMo anti-BMP6 en ratones sanos ha disminuido la expresión hepática de hepcidina y aumentado los niveles séricos de hierro (Andriopoulos et al., 2009). En modelos de ratones transgénicos con exceso de expresión de hepcidina y ATC, el tratamiento con AcMo anti-BMP6 ha mejorado la anemia disminuyendo los niveles e hepcidina (Corradni et al., 2010).

La dianización basada en RNA de reguladores de hepcidina, como oligonucleótidos antisentido HJV y Tfr2 siRNA, está actualmente bajo desarrollo. El tratamiento con Tfr2 siRNA ha demostrado disminuir los niveles de mRNA de hepcidina en un modelo de ratas con ATC (Qerbes et al., 2012).

4.2.2 Nuevas propuestas

Entre las incontables posibilidades a la hora de plantear cómo antagonizar la actividad de la hepcidina, se plantean como mejores opciones las siguientes:

- La aproximación más sencilla para el diseño de un antagonista es la del diseño de una proteína que fuera dirigida contra el extremo N-terminal de la hepcidina, crucial para su función. La opción más viable sería la producción de un anticuerpo monoclonal humanizado contra nuestra diana. De los anticuerpos anti-hepcidina que se encuentran actualmente en desarrollo, existe uno que se une a la hepcidina en F-5 y otro en I-6 (Jordan et al., 2009). Por otro lado, también se podría utilizar la región de la FPN a la que se une la hepcidina. Este fragmento soluble de la FPN también se podría suministrar como fármaco.

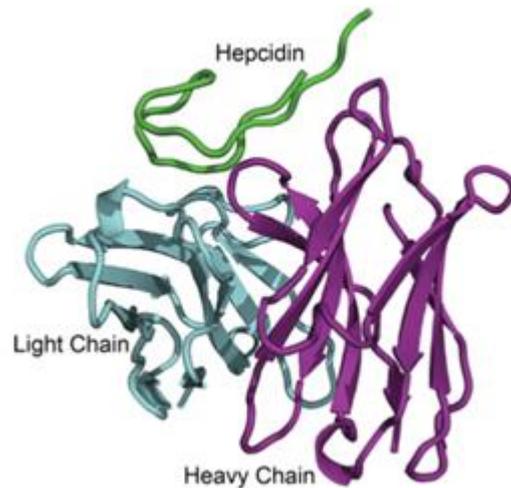


Fig. 8. Estructura por RMN de la interacción entre la hepcidina y un anticuerpo anti-hepcidina.

- Diseño de una proteína que actúe contra su receptor, en concreto que bloquee el residuo Cys326 de la FPN, que como ya hemos visto, es crucial para que se produzca la unión ligando-receptor. En este caso, nuestra proteína no iría dirigida específicamente contra ese residuo, ya que podría activar al receptor como haría la propia hepcidina (estaríamos ante un agonista en lugar de un antagonista).

Si nos basamos en el estudio de Le Gac et al. (2013), que consiste en la descripción del primer modelo en 3D realizado de la FPN, vemos que las doce hélices extracelulares convergen en torno a un poro central (el canal por el que sale el hierro, recordemos que la FPN es un transportador), y, lo que es aún más interesante, que los residuos de triptófano 42 y de histidina 43 están localizadas en la inmediata vecindad de Cys326.

Con estos datos podríamos plantear como diana de nuestra proteína los residuos Trp42 e His43 de la FPN, de tal forma que, al unirse a ellos sin producir la unión de JAK2/FPN con su subsiguiente internalización, impidiera la unión de la hepcidina a Cys326.

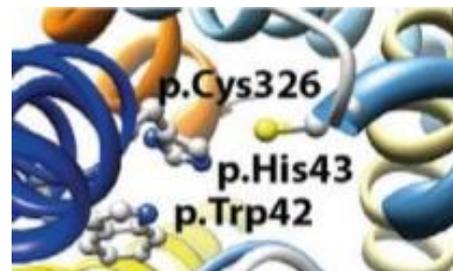


Fig. 9. Fragmento de una imagen tridimensional de la ferroportina, en la que se ve la cercanía espacial de los residuos His43 v Trp42 a Cvs326.

- Diseño de un anticalin® (anticalin es una marca registrada por Piers Pharmaceuticals, anticalina al castellanizarlo) específica contra la hepcidina. Las lipocalinas son una

familia de proteínas caracterizadas por poseer un sitio de unión con una alta plasticidad estructural, compuesto por horquillas de cuatro aminoácidos montadas sobre un barril β estable (Skerra, 2008). Usando mutagénesis aleatorias y selección con bacteriófagos contra dianas moleculares predefinidas es posible generar lipocalinas artificiales con nuevas especificidades de ligando, llamadas anticalinas. En comparación con los anticuerpos, son moléculas mucho más pequeñas (<20 kDa), con una estructura más simple (una sola cadena polipéptida) y no requieren modificaciones post-translacionales.

Recientemente se ha descrito la anticalina PRS-080, la cual se une de forma específica a la hHepc con una afinidad sub-nanomolar. Es un inhibidor específico que impide la unión entre la hepcidina y la FPN. Se ha comprobado su eficacia en monos (*Macaca fascicularis*) (Schwoebel et al., 2013) y actualmente se está preparando el primer ensayo clínico en humanos.

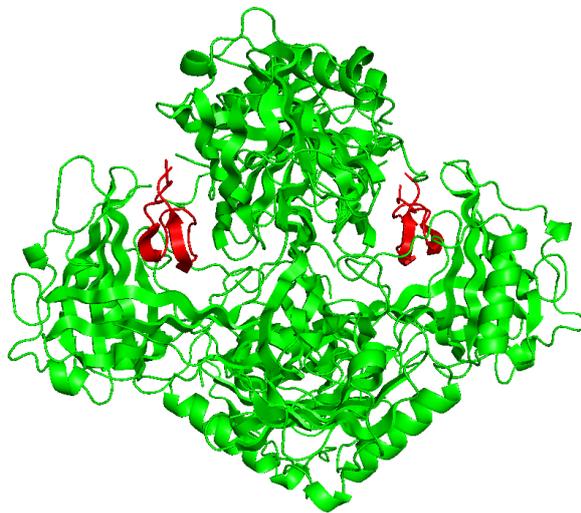


Fig. 10. Imagen obtenida de PyMOL (PDB:4qae) en la que se observa la estructura cristalizada de un anticalin (verde) unido a la hepcidina (rojo).

- Diseño de un Spiegelmer® (Spiegelmer es una marca registrada por NOXXON Pharma AG) contra la hepcidina. Un Spiegelmer es un L-RNA aptámero artificial con una estructura en espejo respecto a los oligonucleótidos naturales (Spiegel significa espejo en alemán). Gracias a sus L-nucleótidos, estas moléculas presentan una mayor resistencia a las nucleasas con respecto a los nucleótidos naturales. El primer Spiegelmer contra la hepcidina, lexaptepid (NOX-H94), ha demostrado unirse a su diana con alta afinidad y se ha confirmado tanto *in vivo* como *in vitro* que bloquea la función biológica de la hepcidina (Schwoebel et al., 2013). En su extremo 5', este Spiegelmer está unido a un polietilenglicol (PEG) de forma covalente, lo que dificulta

su eliminación renal, aumentando su vida media. Actualmente lexaptetid se encuentra en la fase II de un ensayo clínico para el tratamiento de la anemia del cáncer.

4.3 Agonistas de la hepcidina.

4.3.1 “Mini-hepcidina”

Son pequeños péptidos formados por 7-9 aminoácidos cuyo uso terapéutico en situaciones con déficit de hepcidina está aún muy limitado. La vida media de la hepcidina es muy corta debido a su rápida excreción renal. Además, su gran tamaño (~2.7 kDa) hace que tenga una baja absorción si se administra vía oral. La identificación de regiones críticas para la unión de la hepcidina con moléculas de ferroportina (FPN) ha hecho posible el diseño de estos “minihepcidinas”, los cuales imitan la actividad de la hepcidina. Estudios de mutagénesis y modelado biomolecular indican que los 9 primeros aminoácidos del extremo N-terminal de la hepcidina son importantes para su actividad, lo que ha conducido a la síntesis de péptidos N-terminales para aumentar su biodisponibilidad (Preza et al., 2011). Se han introducido aminoácidos artificiales para aumentar la resistencia a la proteólisis y se han conjugado ácidos grasos para aumentar su vida media y aumentar su absorción.

Se ha diseñado y probado la eficacia de una “mini-hepcidina”, la PR65. Su secuencia de extremo N a C terminal es (todos L-aminoácidos): ácido iminotriacético, treonina, histidina, difenilalanina, β-homo prolina, arginina, cisteína, arginina y b-homo fenilalanina. Su extremo C-terminal ha sido derivada con polietilén glicol (PEG) y grupos ácido palmítico (Preza et al., 2011; Ramos et al., 2012). Las “mini-hepcidinas” podrían ser útil para prevenir la sobrecarga de hierro o para tratarla junto a las flebotomías o a la quelación (Fung & Nemeth, 2013).

Recientemente se ha desarrollado una serie de “mini-hepcidinas” con el objetivo de producir una hepcidina ciclada, que tiene una actividad relativa con respecto a la nativa. El ciclaje de la hepcidina resulta en péptidos muy estables con pliegue similar a la hepcidina. Sin embargo, no producen la internalización de la FPN *in vitro* (Clark et al., 2013).

4.3.2 Análogos de BMP6 y pequeñas moléculas activadoras de la vía STAT/SMAD

La señalización BMP/SMAD es uno de los principales mecanismos de regulación en el control de la expresión de hepcidina. HFE interactúa con la vía BMP6/SMAD para regular dicha expresión (Corradini et al., 2010). Agonistas BMP6-like podrían jugar un papel como nueva estrategia terapéutica, siendo un reto técnico la síntesis de anticuerpos que reconozcan de forma específica BMP6 sin producir una reactividad cruzada con otros BMPs. Un estudio de screening a pequeña escala en embriones de peces cebra ha identificado la genisteína como un potenciador de la transcripción de hepcidina (Zhen et al., 2013). La genisteína es una isoflavona biológicamente activa derivada de la soja que ha demostrado diversos efectos beneficiosos para la salud. Existe una creciente evidencia que afirma que la genisteína tiene efectos pleiotrópicos. Influye en la homeostasis de los lípidos y en la resistencia a la insulina, y tiene efecto anti-inflamatorio (Nagaraju et al., 2013). El tratamiento de células HepG2 con genisteína aumenta tanto los niveles de transcripción de hepcidina como la actividad

promotora. La genisteína y otras moléculas candidatas podrían ser desarrolladas para tratar síndromes con sobrecarga de hierro.

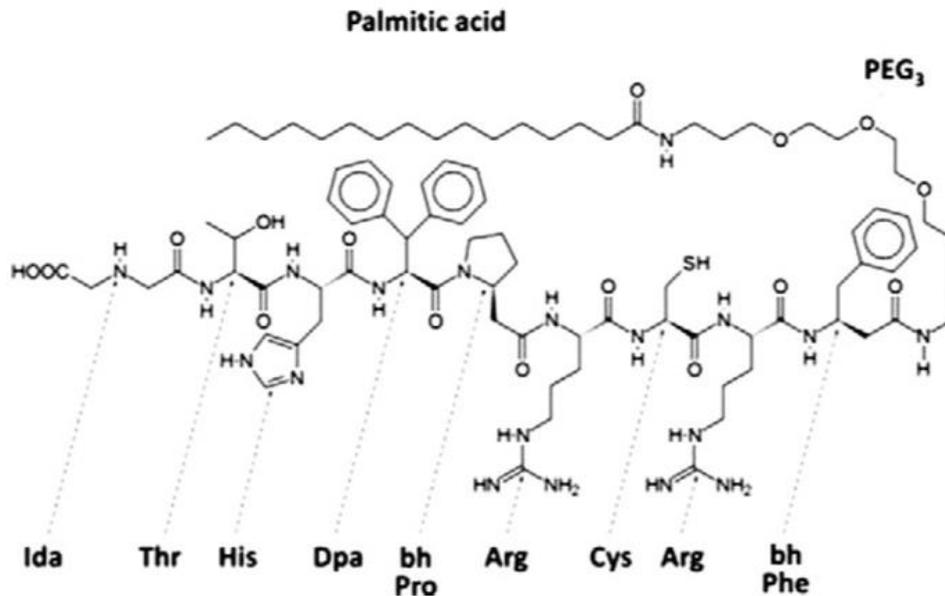


Fig. 11. Estructura de la “mini-hepcidina” PR65.

4.3.3 Nuevas propuestas

Las posibilidades de actuación para diseñar mediante ingeniería un agonista son más limitadas que en el caso de los antagonistas. Se plantea aumentar la actividad biológica de la hepcidina de las siguientes formas:

- Diseño de una proteína que actúe activando la FPN. El proceso de diseñar la proteína que active la FPN no tendría en principio una excesiva complejidad una vez explicada la estructura de la hepcidina y de la FPN (punto 4.1), nuestro agonista tendría como diana el residuo Cys326 de la FPN, y debería unirse a ambos monómeros del receptor (esto último necesario para que entre en juego JAK2 con el consiguiente proceso de activación).

Una vez tenemos claro este punto de partida, podríamos hacer que nuestro agonista tuviera una mayor actividad que la hepcidina natural. Una forma de hacerlo es induciendo de forma aleatoria mutaciones a la hepcidina nativa (como se realizó el diseño de PRS-80) y seleccionando a posteriori aquellas que presentan una mayor afinidad por la FPN. La otra forma, sería mediante un proceso más racional. Para llevar a cabo este último procedimiento, se plantea como una mejora aumentar la vida media de la hepcidina. La hepcidina es eliminada por el riñón, y se piensa que, debido a su pequeño tamaño, se filtra libremente por el glomérulo (Kulaksiz et al., 2005). De esto deducimos que una de las posibilidades para aumentar la vida media de nuestro agonista sería simplemente diseñar un péptido de, al menos, 70kDa (peso molecular

límite para atravesar libremente la membrana basal glomerular). Otra forma de aumentar la vida media del agonista sería aumentar su resistencia a las proteasas. El problema que se nos presenta para llevar a cabo este último procedimiento es que actualmente se desconoce si la hepcidina tiene sitios predominantes de proteasas, por lo que no sería posible hacer un diseño racional. Podríamos de nuevo recurrir a la aleatorización, para, después de producir las mutaciones, calcular mediante Western Blots la concentración al cabo de un periodo de tiempo y seleccionar las que presentan mayor vida media.

- De forma más sencilla que en el caso anterior, se podría simplemente añadir a la hepcidina humana un grupo PEG para disminuir su eliminación renal y aumentar así su actividad con respecto a la proteína nativa.

5. CONCLUSIONES

La hepcidina es la hormona encargada de la regulación de la homeostasis del hierro. Tanto su sobreexpresión como su déficit son causa de enfermedades (anemia de trastornos crónicos y enfermedades por acúmulo de hierro, respectivamente) que actualmente carecen de un tratamiento más allá del meramente sintomático. El reciente descubrimiento de esta hormona reguladora, así como el auge de la ingeniería de proteínas, nos ha permitido comenzar a desarrollar nuevas terapias que pueden llegar a tener un gran impacto en la salud pública (la anemia por trastornos crónicos es el tipo de anemia más frecuente en pacientes hospitalizados, y la segunda más frecuente en general).

En este trabajo se hace una síntesis de los pasos que la comunidad científica ha dado hasta ahora en este proceso y se plantean nuevos posibles modelos terapéuticos mediante la utilización de la ingeniería de proteínas.

6. REFERENCIAS

1. Aggarwal, B. B., & Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 71, 1397–1421.
2. Alkhateeb, A. A., & Connor, J. R. (2013). The significance of ferritin in cancer: anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1836,245 –254.
3. Anderson, G. J., & Darshan, D. (2008). Small-molecule dissection of BMP signaling. *Nat Chem Biol* 4, 15–16.
4. Anderson, G. J., & Vulpe, C. D. (2009). Mammalian iron transport. *Cell Mol Life Sci* 66, 3241–3261.
5. Andriopoulos, B., Jr., Corradini, E., Xia, Y., Faasse, S. A., Chen, S., Grgurevic, L., et al. (2009). BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 41, 482–487.
6. Arruda, S. F., Siqueira, E. M., & de Valencia, F. F. (2009). Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition* 25, 472–478.
7. Ashby, D. R., Gale, D. P., Busbridge, M., Murphy, K. G., Duncan, N. D., Cairns, T. D., et al. (2009). Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int* 75, 976–981.
8. Ashby, D. R., Gale, D. P., Busbridge, M., Murphy, K. G., Duncan, N. D., Cairns, T. D., et al. (2010). Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica* 95, 505–508.
9. Babitt, J. L., & Lin, H. Y. (2010). Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis* 55, 726–741.
10. Bacchetta, J., Zaritsky, J. J., Sea, J. L., Chun, R. F., Lisse, T. S., Zavala, K., et al. (2014). Suppression of iron-regulatory hepcidin by vitamin D. *J Am Soc Nephrol* 25, 564–572.
11. Bayeva, M., Chang, H. C., Wu, R., & Ardehali, H. (2013). When less is more: novel mechanisms of iron conservation. *Trends Endocrinol Metab* 24, 569–577.
12. Brechard, S., & Tschirhart, E. J. (2008). Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. *J Leukoc Biol* 84, 1223–1237.
13. Camaschella, C. (2009). BMP6 orchestrates iron metabolism. *Nat Genet* 41, 386–388.
14. Chang, C. C., Chiu, P. F., Chen, H. L., Chang, T. L., Chang, Y. J., & Huang, C. H. (2013). Simva-statin downregulates the expression of hepcidin and erythropoietin in HepG2 cells.
15. Chiu, P. F., Ko, S. Y., & Chang, C. C. (2012). Vitamin C affects the expression of hepcidin and erythropoietin receptor in HepG2 cells. *J Ren Nutr* 22, 373–376.
16. Clark, R. J., Tan, C. C., Preza, G. C., Nemeth, E., Ganz, T., & Craik, D. J. (2011). Understanding the structure/activity relationships of the iron regulatory peptide hepcidin. *Chem Biol* 18, 336–343.
17. Clark, R. J., Preza, G. C., Tan, C. C., van Dijk, J. W., Fung, E., Nemeth, E., et al. (2013). Design, synthesis, and characterization of cyclic analogues of the iron regulatory peptide hormone hepcidin. *Biopolymers* 100, 519–526.
18. Corradini, E., Schmidt, P. J., Meynard, D., Garuti, C., Montosi, G., Chen, S., et al. (2010). BMP6 treatment compensates for the molecular defect and ameliorates hemochromatosis in Hfe knockout mice. *Gastroenterology* 139, 1721–1729.
19. Cottin, Y., Doise, J. M., Maupoil, V., Tanniere-Zeller, M., Dalloz, F., Maynadie, M., et al. (1998). Plasma iron status and lipid peroxidation following thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Fundam Clin Pharmacol* 12, 236–241.
20. Cuny, G. D., Yu, P. B., Laha, J. K., Xing, X., Liu, J. F., Lai, C. S., et al. (2008). Structure–activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 4388–4392.

21. Daniels, T. R., Bernabeu, E., Rodriguez, J. A., Patel, S., Kozman, M., Chiappetta, D. A., et al. (2012). The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta* 1820,291–317.
22. Darshan, D., & Anderson, G. J. (2009). Interacting signals in the control of hepcidin expression. *Biometals* 22, 77–87.
23. De Domenico, I., Lo, E., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2009). Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3800–3805.
- 24.
25. De Domenico, I., Ward, D. M., Langelier, C., Vaughn, M. B., Nemeth, E., Sundquist, W. I., et al. (2007). The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 18, 2569–2578.
26. de Valk, B., & Marx, J. J. (1999). Iron, atherosclerosis, and ischemic heart disease. *Arch Intern Med* 159, 1542–1548.
27. Delbini, P., Vaja, V., Graziadei, G., Duca, L., Nava, I., Refaldi, C., et al. (2010). Genetic variability of Tmprss6 and its association with iron deficiency anaemia. *Br J Haematol* 151, 281–284.
28. Detivaud, L., Island, M. L., Jouanolle, A. M., Ropert, M., Bardou-Jacquet, E., Le Lan, C., et al. (2013). Ferroportin diseases: functional studies, a link between genetic and clinical phenotype. *Hum Mutat* 34, 1529–1536.
29. Doyle, M. K., Rahman, M. U., Frederick, B., Birbara, C. A., de Vries, D., Toedter, G., et al. (2013). Effects of subcutaneous and intravenous golimumab on inflammatory biomarkers in patients with rheumatoid arthritis: results of a phase 1, randomized, open-label trial. *Rheumatology (Oxford)* 52, 1214–1219.
30. Fatih, N., Camberlein, E., Island, M. L., Corlu, A., Abgueguen, E., Detivaud, L., et al. (2010). Natural and synthetic STAT3 inhibitors reduce hepcidin expression in differentiated mouse hepatocytes expressing the active phosphorylated STAT3 form. *J Mol Med (Berl)* 88, 477–486.
31. Fung, E., & Nemeth, E. (2013). Manipulation of the hepcidin pathway for therapeutic purposes. *Haematologica* 98, 1667–1676.
32. Fung, E., Sugianto, P., Hsu, J., Damoiseaux, R., Ganz, T., & Nemeth, E. (2013). High-throughput screening of small molecules identifies hepcidin antagonists. *Mol Pharmacol* 83, 681–690.
33. Galesloot, T. E., Holewijn, S., Kiemeney, L. A., de Graaf, J., Vermeulen, S. H., & Swinkels, D.W. (2014). Serum hepcidin is associated with presence of plaque in postmenopausal women of a general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 446–456.
34. Galesloot, T. E., Vermeulen, S. H., Geurts-Moespot, A. J., Klaver, S. M., Kroot, J. J., van Tienoven, D., et al. (2011). Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood* 117, e218–e225.
35. Ganz, T. (2005). Hepcidin—a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol* 18, 171–182.
36. Ganz, T. (2013). Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev* 93, 1721–1741.
37. Ganz, T., & Nemeth, E. (2012). Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1823, 1434–1443.
38. Gammella, E., Buratti, P., Cairo, G., & Recalcati, S. (2014). Macrophages: central regulators of iron balance. *Metallomics* 6,1336–1345.
39. Gerjevic, L. N., Liu, N., Lu, S., & Harrison-Findik, D. D. (2012). Alcohol activates TGF-beta but inhibits BMP receptor-mediated Smad signaling and Smad4 binding to hepcidin promoter in the liver. *Int J Hepatol* 2012, 459278.
40. Gkouvatsos, K., Papanikolaou, G., & Pantopoulos, K. (2012). Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta* 1820,188–202.

41. Gudjoncik, A., Guenancia, C., Zeller, M., Cottin, Y., Vergely, C., & Rochette, L. (2014). Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. *Mol Nutr Food Res* 58,1721–1738.
42. Ha, C. E., Ha, J. S., Theriault, A. G., & Bhagavan, N. V. (2009). Effects of statins on the secretion of human serum albumin in cultured HepG2 cells. *J Biomed Sci* 16, 32.
43. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., & Andrews, N. C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117,285–297.
44. Kolluru, G. K., Shen, X., Bir, S. C., & Kevil, C. G. (2013). Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide* 35, 5–20.
45. Koskenkorva-Frank, T. S., Weiss, G., Koppenol, W. H., & Burckhardt, S. (2013). The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radic Biol Med* 65, 1174–1194.
46. Krause, A., Neitz, S., Magert, H. J., Schulz, A., Forssmann, W. G., Schulz-Knappe, P., et al. (2000). LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 480, 147–150.
47. Kulaksiz, H., Theilig, F., Bachmann, S., Gehrke, S. G., Rost, D., Janetzko, A., et al. (2005). The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol* 184, 361–370.
48. G´erald Le Gac, ChandranKa, Rozenn Joubrel, Isabelle Gourlaouen, Pierre Lehn, Jean-Paul Mornon, Claude F´erec and Isabelle Callebaut. Structure-Function Analysis of the Human Ferroportin Iron Exporter (SLC40A1):Effect of Hemochromatosis Type 4 Disease Mutations and Identification of Critical Residues.
49. Lee, P. (2009). Role of matriptase-2 (TMPRSS6) in iron metabolism. *Acta Haematol* 122, 87–96.
50. MacKenzie, E. L., Iwasaki, K., & Tsuji, Y. (2008). Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 10, 997–1030.
51. Millionig, G., Ganzleben, I., Peccerella, T., Casanovas, G., Brodziak-Jarosz, L., Breitkopf-Heinlein, K., et al. (2012). Sustained submicromolar H₂O₂ levels induce hepcidin via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *J Biol Chem* 287, 37472–37482.
52. Munoz, M., Garcia-Erce, J. A., & Remacha, A. F. (2011). Disorders of iron metabolism. Part II: iron deficiency and iron overload. *J Clin Pathol* 64,287–296.
53. Munoz-Bravo, C., Gutierrez-Bedmar, M., Gomez-Aracena, J., Garcia-Rodriguez, A., & Navajas, J. F. (2013). Iron: protector or risk factor for cardiovascular disease? Still controversial. *Nutrients* 5, 2384–2404.
54. Nagaraju, G. P., Zafar, S. F., & El-Rayes, B. F. (2013). Pleiotropic effects of genistein in metabolic, inflammatory, and malignant diseases. *Nutr Rev* 71, 562–572.
55. Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K., et al. (2004a). IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113, 1271–1276.
56. Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., et al. (2004b). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306, 2090–2093.
57. Oliveira, S. J., de Sousa, M., & Pinto, J. P. (2011). ER stress and iron homeostasis: a new frontier for the UPR. *Biochem Res Int* 2011, 896474.
58. Palaneeswari, M. S., Ganesh, M., Karthikeyan, T., Devi, A. J., & Mythili, S. V. (2013). Hepcidin—minireview. *J Clin Diagn Res* 7, 1767–1771.
59. Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., & Ganz, T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276, 7806–7810.
60. Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., et al. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276, 7811–7819.

61. Pinto, J. P., Ribeiro, S., Pontes, H., Thowfeequ, S., Tosh, D., Carvalho, F., et al. (2008). Eryth-ropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha. *Blood* 111, 5727–5733.
62. Piperno, A., Galimberti, S., Mariani, R., Pelucchi, S., Ravasi, G., Lombardi, C., et al. (2011). Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project. *Blood* 117, 2953–2959.
63. Poli, M., Asperti, M., Naggi, A., Campostrini, N., Girelli, D., Corbella, M., et al. (2014). Glycol-split nonanticoagulant heparins are inhibitors of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood* 123, 1564–1573.
64. Poli, M., Girelli, D., Campostrini, N., Maccarinelli, F., Finazzi, D., Lusciati, S., et al. (2011). Hep-arin: a potent inhibitor of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood* 117, 997–1004.
65. Preza, G. C., Ruchala, P., Pinon, R., Ramos, E., Qiao, B., Peralta, M. A., et al. (2011). Minihepcidins are rationally designed small peptides that mimic hepcidin activity in mice and may be useful for the treatment of iron overload. *J Clin Invest* 121, 4880–4888.
66. Querbes, W., Bogorad, R. L., Moslehi, J., Wong, J., Chan, A. Y., Bulgakova, E., et al. (2012). Treatment of erythropoietin deficiency in mice with systemically administered siRNA. *Blood* 120, 1916–1922.
67. Ramos, E., Ruchala, P., Goodnough, J. B., Kautz, L., Preza, G. C., Nemeth, E., et al. (2012). Minihepcidins prevent iron overload in a hepcidin-deficient mouse model of severe hemochromatosis. *Blood* 120, 3829–3836.
68. Riganti, C., Campia, I., Kopecka, J., Gazzano, E., Doublier, S., Aldieri, E., et al. (2011). Pleio-tropic effects of cardioactive glycosides. *Curr Med Chem* 18, 872–885.
69. Rochette, L., Cottin, Y., Zeller, M., & Vergely, C. (2013). Carbon monoxide: mechanisms of action and potential clinical implications. *Pharmacol Ther* 137, 133–152.
70. Saeed, O., Otsuka, F., Polavarapu, R., Karmali, V., Weiss, D., Davis, T., et al. (2012). Pharma-cological suppression of hepcidin increases macrophage cholesterol efflux and re-duces foam cell formation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 299–307.
71. Sasu, B. J., Cooke, K. S., Arvedson, T. L., Plewa, C., Ellison, A. R., Sheng, J., et al. (2010). Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood* 115, 3616–3624.
72. Schmidt, P. J., Toudjarska, I., Sendamarai, A. K., Racie, T., Milstein, S., Bettencourt, B. R., et al. (2013). An RNAi therapeutic targeting Tmprss6 decreases iron overload in Hfe(–/–) mice and ameliorates anemia and iron overload in murine beta-thalassemia intermedia. *Blood* 121, 1200–1208.
73. Schroeder, S. E., Reddy, M. B., & Schalinske, K. L. (2007). Retinoic acid modulates hepatic iron homeostasis in rats by attenuating the RNA-binding activity of iron regulatory proteins. *J Nutr* 137, 2686–2690.
74. Schwoebel, F., van Eijk, L. T., Zboralski, D., Sell, S., Buchner, K., Maasch, C., et al. (2013). The effects of the anti-hepcidin Spiegelmer NOX-H94 on inflammation-induced anemia in cynomolgus monkeys. *Blood* 121, 2311–2315. doi: 10.1182/blood-2012-09-456756
75. Sicard, P., Acar, N., Gregoire, S., Lauzier, B., Bron, A. M., Creuzot-Garcher, C., et al. (2007). Influence of rosuvastatin on the NAD(P)H oxidase activity in the retina and electroret-inographic response of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 151, 979–986.
76. Sicard, P., Delemasure, S., Korandji, C., Grand, A. S. L., Lauzier, B., Guillard, J. C., et al. (2008). Anti-hypertensive effects of Rosuvastatin are associated with decreased inflammation and oxidative stress markers.
77. Silvestri, L., Pagani, A., & Camaschella, C. (2008). Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood* 111, 924–931.

78. Sun, C. C., Vaja, V., Chen, S., Theurl, I., Stepanek, A., Brown, D. E., et al. (2013). A hepcidin lowering agent mobilizes iron for incorporation into red blood cells in an adenine-induced kidney disease model of anemia in rats. *Nephrol Dial Transplant* 28, 1733–1743.
79. Tanno, T., Bhanu, N. V., Oneal, P. A., Goh, S. H., Staker, P., Lee, Y. T., et al. (2007). High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 13, 1096–1101.
80. Tanno, T., Noel, P., & Miller, J. L. (2010). Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr Opin Hematol* 17, 184–190.
81. Theurl, I., Schroll, A., Sonnweber, T., Nairz, M., Theurl, M., Willenbacher, W., et al. (2011). Pharmacologic inhibition of hepcidin expression reverses anemia of chronic inflammation in rats. *Blood* 118, 4977–4984.
82. Tsuji, Y. (2005). JunD activates transcription of the human ferritin H gene through an antioxidant response element during oxidative stress. *Oncogene* 24, 7567–7578.
83. van Rhee, F., Fayad, L., Voorhees, P., Furman, R., Lonial, S., Borghaei, H., et al. (2010). Siltuximab, a novel anti-interleukin-6 monoclonal antibody, for Castleman's disease. *J Clin Oncol* 28, 3701–3708.
84. Vecchi, C., Montosi, G., Zhang, K., Lamberti, I., Duncan, S. A., Kaufman, R. J., et al. (2009). ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science* 325, 877–880.
85. Vujic, M. (2014). Molecular basis of HFE-hemochromatosis. *Front Pharmacol* 5,42.
86. Waldvogel-Abramowski, S., Waeber, G., Gassner, C., Buser, A., Frey, B. M., Favrat, B., et al. (2014). Physiology of iron metabolism. *Transfus Med Hemother* 41, 213–221.
87. Wang, H., Dong, J., Zuo, L., Liu, J., Zhu, W., Li, Y., et al. (2014). Anti-mouse CD52 monoclonal antibody ameliorates iron-deficient anaemia in IL-10 knockout mice. *Br J Nutr* 111, 987–995.
88. Yin, S., Wang, Z., & Bernstein, E. R. (2013). Formaldehyde and methanol formation from reaction of carbon monoxide and hydrogen on neutral Fe₂S₂ clusters in the gas phase. *Phys Chem Chem Phys* 15, 4699–4706.
89. Yu, P. B., Hong, C. C., Sachidanandan, C., Babitt, J. L., Deng, D. Y., Hoyng, S. A., et al. (2008). Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol* 4, 33–41.
90. Zhen, A. W., Nguyen, N. H., Gibert, Y., Motola, S., Buckett, P., Wessling-Resnick, M., et al. (2013). The small molecule, genistein, increases hepcidin expression in human hepatocytes. *Hepatology* 58, 1315–1325.