

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA DE MÉDICO CIRUJANO
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL**



**PRESENCIA DE NEUROGLOBINA EN SUJETOS DEFICIENTES EN HIERRO.
ESTUDIO EXPERIMENTAL**

TESIS:

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MÉDICO CIRUJANO

PRESENTA:

MPSS. EDGAR MARTINEZ SANCHEZ

DIRECTORA:

DRA. EN C. PATRICIA VIEYRA REYES

M EN C.F. VIRGILIO EDUARDO TRUJILLO CONDES

REVISORES

M. EN C.Q. MARÍA GUADALUPE ENRÍQUEZ MEJÍA

DR. RIGORBERTO OROS PANTOJA

**PRESENCIA DE NEUROGLOBINA EN SUJETOS DEFICIENTES EN HIERRO.
ESTUDIO EXPERIMENTAL**

ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO	8
1.1 Globinas y tipos de globinas	8
1.2 Estructura de la neuroglobina	8
1.3 Cinética de la neuroglobina	10
1.4 Filogenética de la neuroglobina	11
1.5 Distribución de la neuroglobina.....	12
1.5.1 Distribución sistémica de neuroglobina	12
1.5.2 Distribución intracelular de neuroglobina.....	14
1.6 Mecanismo de control de la expresión de neuroglobina	15
1.7 Neuroglobina y neuroprotección	17
1.7.1 Neuroglobina como una molécula de señalización.....	18
1.7.2 Neuroglobina: Vías oxidativas e hipoxia	18
1.7.3 Neuroglobina: Vías de supervivencia celular y apoptosis	19
1.7.4 Neuroglobina y ATP	19
1.8 Neuroglobina y neurogénesis	20
1.9 Hierro como metal divalente	22
1.10 Metabolismo del hierro	23
1.10.1 Absorción del hierro	24
1.10.2 Hierro: Uso, reciclaje y almacenamiento	24
1.10.3 Regulación sistémica de hierro	25
1.10.4 Regulación intracelular del hierro	26
1.11 Metabolismo del hierro en fetos e infantes.....	26
1.12 Deficiencia de hierro	27
1.12.1 Deficiencia de hierro en etapas tempranas de la vida	28
1.12.2 Deficiencia de hierro y efectos adversos en el neurodesarrollo	30
1.13 Áreas cerebrales más afectadas por deficiencia de hierro	37
1.13.1 Deficiencia de hierro e hipocampo	37
1.13.2 Deficiencia de hierro y corteza prefrontal	42
1.13.3 Deficiencia de hierro y cuerpo estriado	43
1.14 Neuroglobina y deficiencia de hierro	45
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46

3. JUSTIFICACIÓN	47
4. HIPÓTESIS.....	48
5. OBJETIVO	49
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	49
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
6. MÉTODO	50
6.1 Operacionalización de variables	50
6.2 Diseño de estudio	50
6.3 Universo de trabajo y muestra (Método de muestreo)	50
6.3.1 Sujetos de estudio.....	50
6.3.2 Modelos animales	50
6.4 Técnica	51
6.4.1 Obtención de muestras de tejido cerebral para inmunofluorescencia... 51	
6.4.2 Corte de tejido cerebral en parafina para inmunofluorescencia	52
6.4.3 Inmunofluorescencia	53
6.4.4 Obtención de imágenes	54
6.4.5 Procesamiento de imágenes	57
6.6 Instrumento de investigación	58
6.7 Procedimiento.....	58
6.8 Límite de tiempo y espacio	58
6.9 Implicaciones éticas.....	59
6.7 Presupuesto y financiamiento	59
6.8. Análisis estadístico	59
7. RESULTADOS.....	60
7.1 Hipocampo	60
7.2 Corteza prefrontal.....	63
7.3 Cuerpo Estriado.....	66
8. DISCUSIÓN	70
9. Conclusiones	75
10. Perspectivas de estudio	75
12. Bibliografía	76
12. Anexos	95

RESUMEN

La neuroglobina (Ngb) es una hemo-proteína expresada en tejido nervioso de varias especies animales, incluidos los mamíferos. Dentro de su estructura, Ngb posee un ion hierro, el cual es primordial para que pueda cumplir sus funciones como factor neuroprotector y neurogénico. A nivel cerebral Ngb se encuentra ampliamente expresada tanto en regiones corticales como subcorticales. Por otra parte, la deficiencia de hierro (DFe) es una patología extremadamente común a nivel mundial y se relaciona con diversas afecciones neurológicas crónicas e irreversibles. El sustrato fisiopatológico de estas afecciones se debe en gran parte a la deficiente incorporación de hierro a proteínas en áreas cerebrales como hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado. Sin embargo, a la fecha no se dispone de evidencia sobre la existencia de alteraciones en la presencia de Ngb en hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado ante DFe. Por este motivo, nos dimos a la tarea de realizar un modelo de DFe en rata Wistar desde la gestación hasta la adultez. Posteriormente realizamos inmunofluorescencia en hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado contra Ngb. Más tarde, mediante el software Image-Pro® Plus Version 7.0 realizamos análisis colorimétrico del color verde en las microfotografías, para así obtener el área con marcaje y densidad de marcaje de Ngb. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico y los resultados con valores $p \leq 0.05$ se consideraron como estadísticamente significativos. Finalmente, encontramos que el hipocampo y la corteza prefrontal de sujetos DFe presentaron disminución neuronal de la presencia de Ngb. Además, tanto en neuronas de hipocampo como de corteza prefrontal de sujetos DFe se observó mayor presencia de Ngb fuera del soma, probablemente en dendritas y axones. Por el contrario, en el cuerpo estriado los sujetos DFe presentaron un incremento neuronal en la presencia de Ngb. Más aún, en neuronas del cuerpo estriado la localización de Ngb fue esencialmente somática.

ABSTRACT

Neuroglobin (Ngb) is a heme-protein expressed in nervous tissue of various animal species, including mammals. Within its structure, Ngb has an iron ion, which is essential for it to fulfill its functions as a neuroprotective and neurogenic factor. At the brain level, Ngb is widely expressed in both cortical and subcortical regions. On the other hand, iron deficiency (DFe) is an extremely common pathology worldwide and is related to various chronic and irreversible neurological conditions. The pathophysiological substrate of these conditions is largely due to the poor incorporation of iron into proteins in brain areas such as the hippocampus, prefrontal cortex, and striatum. However, to date there is no evidence on the existence of alterations in the presence of Ngb in the hippocampus, prefrontal cortex, and striatum in the face of DFe. For this reason, we undertook the task of carrying out a model of DFe in the Wistar rat from gestation to adulthood. Subsequently, we performed immunofluorescence in the hippocampus, prefrontal cortex and striatum against Ngb. Later, using Image-Pro® Plus Version 7.0 software, we performed colorimetric analysis of the green color in the microphotographs, in order to obtain marking area and marking density of Ngb. The data obtained was subjected to statistical analysis and the results with values $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. Finally, we found that the hippocampus and the prefrontal cortex of DFe subjects presented a neuronal decrease in the presence of Ngb. Furthermore, both in hippocampal and prefrontal cortex neurons from DFe subjects, a greater presence of Ngb was observed outside the soma, probably in dendrites and axons. On the contrary, in the striatum the DFe subjects presented a neuronal increase in the presence of Ngb. Besides, in neurons of the striatum the location of Ngb was essentially somatic.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Globinas y tipos de globinas

Las globinas son proteínas expresadas ampliamente en varios dominios de la vida y tienen la capacidad de unirse al oxígeno en virtud de su ion hierro. Se han encontrado cuatro miembros de la familia de las globinas que incluyen: hemoglobina (Hb), citoglobina, mioglobina (Mb) y neuroglobina (Ngb) (1). En el año 2000, se descubrió la primera globina nerviosa en vertebrados, se le llamó neuroglobina, debido a que se identificó en tejido neuronal de humanos y ratones (1).

1.2 Estructura de la neuroglobina

La estructura tridimensional de Ngb tanto humana como murina es globular, compuesta por ocho hélices alfa y un grupo prostético hemo (Fe-protoporfirina IX). Las hélices alfa A, B, E, F, G y H se conforman en una estructura de dos capas (2-4); la cual compone el clásico emparedado alfa helicoidal 3-sobre-3, similar a las proteínas hémicas Mb y Hb (5, 6) (Fig. 1).

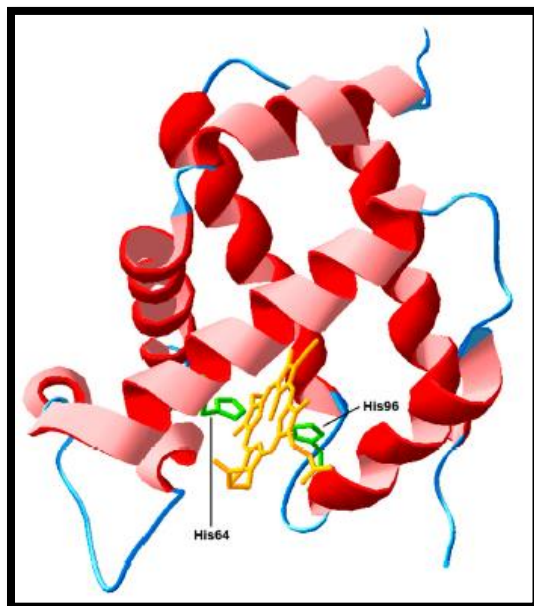


Fig. 1. Modificado de (7). Estructura 3D de la proteína Ngb humana, en verde dos cadenas de histidina (His64 y His96), las cuales se encuentran interactuando con el grupo hemo que se muestra en amarillo.

La estructura primaria de Ngb comprende 151 aminoácidos con una masa molecular de 17 kDa y comparte 20-25% de la identidad con Mb y Hb (8, 9). Esta estructura primaria de Ngb comparte múltiples secuencias de alineación de aminoácidos entre especies, lo cual indica una estrecha relación entre especies, incluso la identidad de aminoácidos entre los humanos y los murinos es de 94% (2, 10).

El conjunto de un anillo porfirínico con un ion hierro recibe el nombre de grupo hemo, este grupo es rodeado por un pliegue polipeptídico de hélice alfa de la globina, la cual a través de uno de sus residuos de histidina se une covalentemente al grupo hemo (11). El ion hierro del grupo prostético hemo puede encontrarse en su forma férrica o ferrosa, además, este ion puede hallarse hexacoordinado o pentacoordinado. El ion hierro de Ngb se halla principalmente hexacoordinado por una histidina proximal (HisF8 o His-96), cuatro pirroles nitrogenados (del anillo porfirínico) y por último, una histidina distal (HisE7 o His-64) o un ligando externo. Sin embargo, una pequeña proporción de Ngb presenta al ion hierro pentacoordinado, ya que la histidina distal o HisE7 ha sido disociado térmicamente

(Fig. 1). Cuando Ngb se encuentra en la configuración con el ion hierro en su forma ferrosa y pentacoordinado, puede ser reactiva a ligandos exógenos (12-14) (Fig. 2).

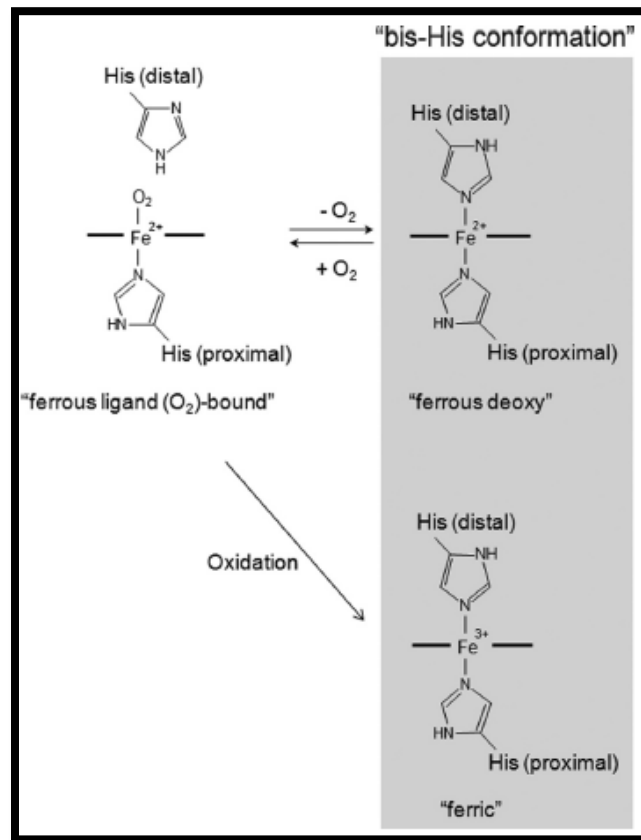


Fig. 2. Modificado de (15). Ilustración esquemática de los hemos en su forma ferrosa-unida a ligando, ferrosa desoxigenada y férrica.

1.3 Cinética de la neuroglobina

En equilibrio al menos 95% de los desoxi hemos (deoxyNgb, Fe²⁺ o reducidos) se encuentran hexacoordinados, lo que indica una fuerte afinidad de la histidina distal por el hemo. El espectro de Ngb ferrica (metNgb, Fe³⁺ u oxidada) también exhibe dicha configuración hexacoordinada, ya que la sexta coordinación es ocupada por un ligando externo (14). Por lo tanto, para que un ligando exógeno pueda unirse a Ngb, se requiere de la disociación de la unión de coordinación distal (His-64-Fe). Así, la unión a O₂, NO o CO está limitada por formación de un intermediario

pentacoordinado, el cual se puede encontrar en Ngb reducida o ferrosa (Fe^{2+} o desoxi), y cuyo valor en equilibrio se encuentra en $<0.1\%$ de Ngb murina (8).

Estudios de fotólisis por flash revelan que Ngb al encontrarse pentacoordinada (no unida a la histidina distal y en estado ferroso o Fe^{2+}) tiene una alta tasa de recombinación para el O_2 y CO. Sin embargo, si la histidina distal se encuentra unida al hierro, es decir, el hierro se encuentra hexacoordinado por esta histidina, la unión con O_2 y CO se vuelve demasiado lenta. Entonces la afinidad real de estos ligandos por Ngb humana es moderada, debido a que la mayoría de Ngb se encuentra hexacoordinada por la histidina distal y los ligandos deben competir con esta coordinación para su unión con el hierro. Sin embargo, ante concentraciones elevadas de CO la unión de este ligando con Ngb se ve favorecida, observándose al mismo tiempo una disminución en la fracción de hemos unidos a histidina distal, lo que indica un aumento de los hemos pentacoordinados (14).

Ante un ambiente con concentraciones similares de O_2 y NO, se forman los aductos Ngb O_2 (oxyNgb) y NgbNO, cuyos destinos son diferentes. La formación del aducto NgbNO parece ser una vía terminal, ya que este aducto se encuentra aparentemente congelado al ser su disociación térmica muy lenta. Por otra parte, el aducto Ngb O_2 posee una vía más dinámica, al ser esta oxigenación rápidamente reversible. La Ngb O_2 al poseer un alto grado de autooxidación puede reaccionar rápida e irreversiblemente con el NO libre, cediendo como productos finales: NO_3^- y metNgb, lo que podría corresponder a un mecanismo de limpieza de NO (16-18).

1.4 Filogenética de la neuroglobina

Antes de que ocurriera la división de los superfamilios protostomia y deuterostomia (los dos grandes linajes en los que se dividen los animales de simetría bilateral), una rama antigua de las globinas se apartó de las demás, a esta última rama pertenecen Ngb y GbX –globina X- (1, 19, 20). El gen de Ngb aparece como una sola copia en todas las especies, con excepción de la trucha, este gen se compone de tres intrones a diferencia de los dos intrones hallados en genes de otras globinas de la

mayoría de los vertebrados e invertebrados. Se piensa que este tercer intrón estuvo presente en un antecesor globínico (21, 22).

Durante la evolución de Ngb los eventos de inserción/delección han sido escasos y se limitan a algunas terminales amino y carboxilo. Entre Ngbs de diferentes especies se encuentran estrictamente conservados 70 aminoácidos, lo que corresponde a 46.4% de las posiciones. Dicho esto, la tasa de sustitución de aminoácidos es baja para Ngb ($\sim 0.4 \times 10^{-9}$ reemplazos de aminoácidos por sitio por año en mamíferos), lo cual representa solamente una tercera parte de la tasa de sustitución de Hb. Adicionalmente, los residuos de aminoácidos que se asocian a ligandos así como el hemo, son invariantes entre Ngbs de diferentes especies. (19, 23). Por lo tanto, la unión a ligandos tanto en humanos, ratones y pez zebra es idéntica, otro dato de que Ngb se ha conservado bastante durante su evolución (8, 24).

1.5 Distribución de la neuroglobina

1.5.1 Distribución sistémica de neuroglobina

La Ngb se encuentra ampliamente expresada tanto en áreas cerebrales como en el sistema nervioso periférico (1) (Fig. 3). Ngb humana puede ser encontrada en concentraciones relativamente elevadas dentro de células con actividad metabólica alta y en ciertas células especializadas, como las neuronas del hipotálamo y de la retina, cuyas concentraciones pueden alcanzar hasta 100 μM (25). Dentro de retina vascular de rata y ratón, Ngb es especialmente expresada en segmentos internos del fotorreceptor, capas plexiformes y capa de células ganglionares (26, 27). Resulta interesante que las regiones más susceptible a la hipoxia dentro de la retina son el segmento interno de los fotorreceptores y las capas plexiformes internas, donde Ngb puede aumentar la captación de O_2 en un 30-40% y prevenir la hipoxia (28).

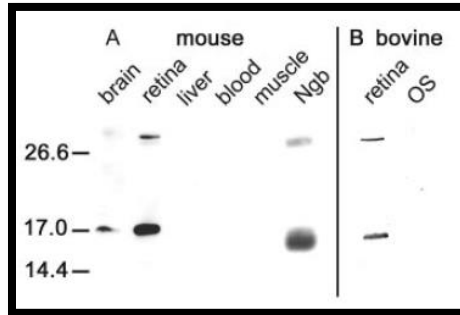


Fig. 3. Modificado de (25). Expresión tisular de la proteína Ngb a través de análisis Western blot. La Ngb fue detectada en cerebro y retina mediante anticuerpos dirigidos contra un péptido sintético de Ngb.

En otras partes de sistema nervioso central Ngb se expresa en concentraciones relativamente bajas ($\sim 1 \mu\text{M}$) (1, 11, 13, 29-34). La Ngb se encuentra ubicua en: bulbo olfatorio, nervio óptico, núcleo del tracto solitario, cerebro (capas corticales II-VI), regiones subcorticales (p. ej. amígdala y tálamo), tronco cerebral y cerebelo. Por lo tanto, la expresión de Ngb es una característica general de las células nerviosas (31, 32, 35-37). La Ngb también se expresa en la sustancia gris de la médula espinal, e incluso se ha encontrado mRNA de Ngb en el sistema nervioso periférico, en ganglios autónomos y sensoriales, y en varios neurotransmisores cerebrales (37-39).

Por medio de qRT-PCR (reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa), inmunohistoquímica y Western blot, se ha encontrado expresión alta de Ngb en coclea de ratón, rata y humano (40-42). Además, la expresión de Ngb también ha sido descrita en astrocitos, glia retinal y células de glioblastoma (32-34, 43-47). Por otra parte, en tejidos no neurales tanto de humanos como de roedores, se ha reconocido expresión del mRNA y de la proteína Ngb en: tejidos normales y tumorales (p. ej. mama, riñón y pulmón), tracto gastrointestinal y tejido endócrino (p. ej. glándula adrenal y pituitaria, e islotes de Langerhans) (10, 11, 30, 36, 37, 48-54).

Se ha demostrado inmunomarcaje específico a Ngb en sistema nervioso central. En todas las capas corticales del cerebro se encontró débil inmunorreactividad (IR) a

Ngb. También, se ha observado marcaje neuronal de moderado a fuerte en zonas subcorticales como tálamo e hipotálamo. Los núcleos de los nervios craneales del tronco encéfalico han mostrado Ngb-IR (inmunorreactividad a neuroglobina), siendo el núcleo hipogloso, vestibular lateral y cerebeloso lateral, los que exhibieron marcaje fuerte. Además, se ha demostrado marcaje relativamente fuerte en células de Purkinje de la corteza cerebelosa (30) (Fig. 4).

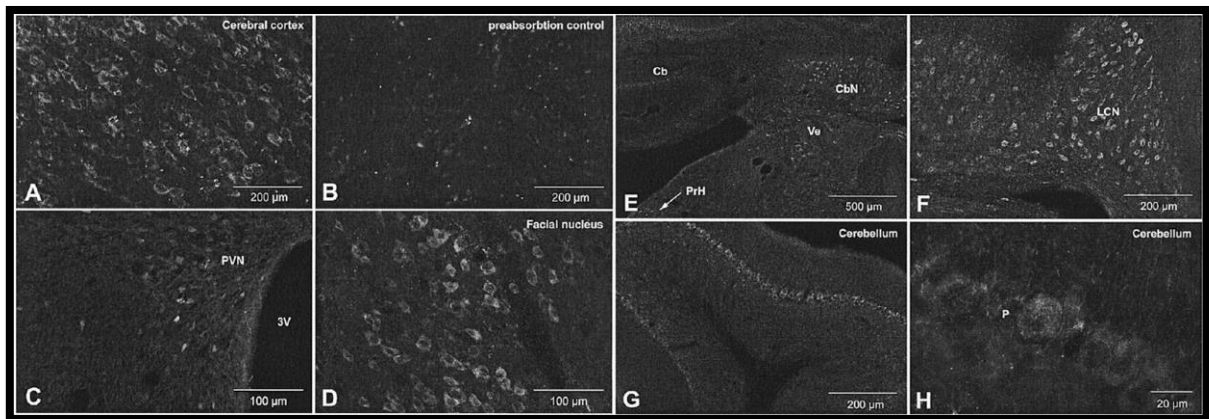


Fig. 4. Composición de imágenes tomadas de (30). Inmunofluorescencia de Ngb en regiones cerebrales de ratón. (A) Neuronas inmunorreactivas en la corteza cerebral, las cuales no son detectadas bloquear el anticuerpo (B). (C) Neuronas en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN); (D) núcleo del nervio facial; (E) tronco encefálico dorsal, hipogloso preposital (PrH), núcleos vestibular (Ve) y cerebeloso (CbN); (F) núcleo cerebeloso lateral (LCN); (G) cerebelo (Cb); (H) mayor aumento de (G) mostrando marcaje en pericaria y procesos de células de Purkinje (P).

1.5.2 Distribución intracelular de neuroglobina

En cuánto a la localización subcelular de Ngb, los primeros estudios sólo reconocían la localización citoplasmática de la neuroglobina (Fig. 5), detectándose constantemente en el pericarion, los procesos axonales, en varicosidades axonales y en sinapsis terminales (25, 30, 36, 37, 50, 55). Estudios más recientes con ayuda de localización inmune, fraccionamiento celular y microscopio de electrones, han encontrado que en las neuronas Ngb es expresada en el citosol, la pared interna de la mitocondria y el núcleo (31, 56-58). Es importante resaltar que la concenctración de Ngb, así como su compartimentalización entre organelos

celulares, pueden cambiar ante estímulos patológicos como el estrés oxidativo o los estímulos hormonales (56-60).

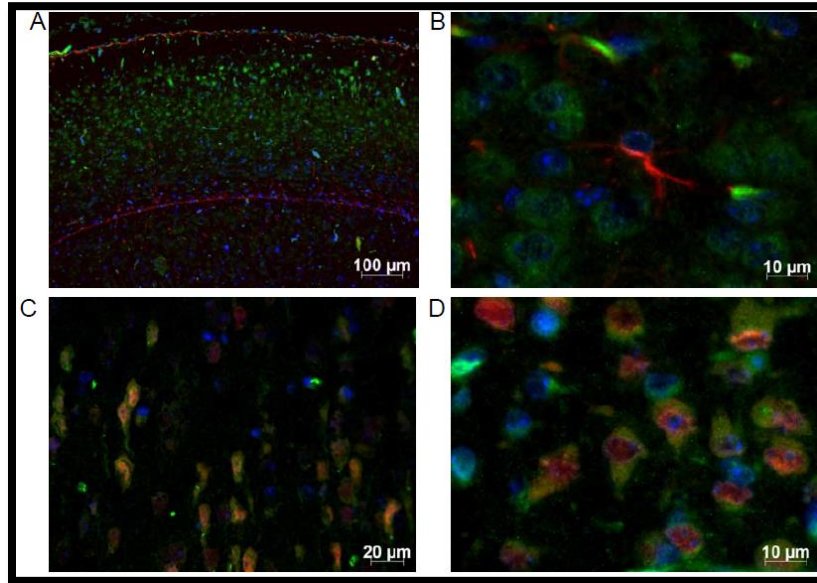


Fig. 5. Modificado de (61). Inmunofluorescencia de Ngb en corteza cerebral de ratón normóxico en P7 (días postnatal 7). En A y B, Ngb se muestra en verde y GFAP (proteína ácida fibrilar glial, marcador de células gliales) en rojo. A, vista general de la corteza parietal donde se observa co-tinción de Ngb con GFAP, las células de las capas corticales II y III muestran predominancia de Ngb(+). B, la magnificación de la imagen previa no revela la expresión de Ngb en células gliales GFAP(+). En C y D, Ngb se muestra en verde y NeuN (núcleo neuronal, marcador neuronal) en rojo, la co-tinción de Ngb con NeuN demuestra la localización de Ngb dentro de las neuronas.

1.6 Mecanismo de control de la expresión de neuroglobina

El gen humano de Ngb está ubicado en el brazo largo del cromosoma 14 en la posición q24.3 (GeneBank reference sequence AF422796). Este gen se encuentra integrado en los mamíferos por cuatro exones y tres intrones conservados. Las Ngbs de los vertebrados mantienen la posición de estos tres intrones dentro de su región codificante (62). Así, el gen de Ngb codifica un único transcripto que es duplicado a partir de su cadena inversa y cuya secuencia incluye 376-828 nucleótidos (GeneBank reference sequence NM_021257.3). No se han encontrado

variantes de empalme en la secuencia del cDNA de Ngb, por lo tanto, su secuencia se encuentra altamente conservada (63).

El promotor del gen de Ngb humana contiene varios sitios de unión para factores de transcripción como lo son: dos sitios de unión a elementos silenciadores neuro-restrictivos (NRSE) y dos cajas-GC (GC1 y GC2) (64-67). Es muy probable que los NRES sean los responsables de la mayor expresión de Ngb en neuronas, ya que células no neuronales expresan factores silenciadores neuro-restrictivos (NRSF) los cuales se unen a dichos NRES (24, 68). Posiblemente, los miembros de la familia de proteínas de especificidad (Sp 1 y 3) se unen a GC1 y GC2, cooperando en la expresión de Ngb (67, 69).

Tanto en humanos como en ratas y ratones, la región promotora de Ngb se encuentra bien conservada y presenta otros sitios de unión para factores de transcripción como CREB (proteína de unión a elementos de respuesta cAMP), EGR-1 (proteína 1 de respuesta temprana a crecimiento), NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y Sp1, los cuales regulan la expresión basal de Ngb. Asimismo, NF- κ B, Sp1 y HIF-1 (factor-1 inducido por hipoxia) son necesarios para la sobreexpresión de Ngb en condiciones de hipoxia (69-71).

Se ha encontrado una región potenciadora en el primer intron de la Ngb, cuya actividad es controlada tanto por la actividad del promotor como por la hormona esteroidea 17β -estradiol (E2). El E2 induce la unión de su receptor α (ER α) a esta región potenciadora, dando lugar a modificaciones epigenéticas activadoras (72). Por último, ya que el promotor de Ngb se encuentra dentro de islas CpG, los mecanismos remodeladores de la cromatina a partir de la metilación del DNA parecen estar involucrados en la expresión específica de Ngb dentro de los diferentes tejidos (67).

1.7 Neuroglobina y neuroprotección

Burmester y Hankeln en 2009 propone las siguientes funciones de Ngb: 1) provisión de O₂ a las mitocondrias de las neuronas metabólicamente activas, 2) limpiadora de ROS –especies reactivas de oxígeno- y RNS –especies reactivas de nitrógeno-, 3) conversión de NO a nitrato en condiciones de normoxia, y producción de NO a partir de nitrato en condiciones de hipoxia, 4) inhibición de la disociación de GDP de la subunidad α de la proteína G, y 5) prevención de la apoptosis a partir de la reducción de citocromo c (29) (Fig. 6).

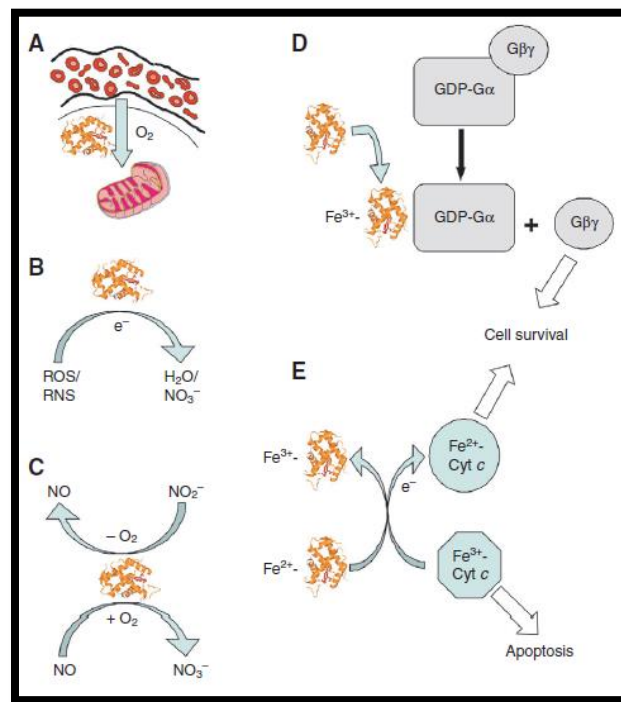


Fig. 6. Modificado de (29). Funciones de Ngb: (A) suplemento de oxígeno a la cadena de electrones de la mitocondria, (B) detoxificación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, (C) conversión de NO a NO₃⁻ a altas pO₂ y NO₂⁻ a NO ante bajas pO₂, (D) actuar como proteína de señalización al inhibir la disociación de GDP de G α y (E) prevención de la vía de apoptosis inducida por hipoxia al reducir el citocromo c.

1.7.1 Neuroglobina como una molécula de señalización

Se ha sugerido que Ngb tiene un papel en la señalización intracelular, debido a que su concentración local es suficiente y por la amplia variación que presenta su estructura terciaria durante el cambio de Ngb-II (ferrosa) a Ngb-III (ferrica) (15). Por ejemplo, se ha propuesto la participación de Ngb en la “vía de señalización de la transducción activada por isquemia y reperfusión”, que ocurre ante la sobreproducción de NO y ROS. La función de Ngb como señalizadora de la transducción está vinculada a su estado redox, ya que sólo la Ngb-III (ferrica) se une a Gai para fungir como GDI (inhibidor de la disociación de GDP) (73). Más aún, durante el estrés oxidativo se originan cambios estructurales en la neuroglobina, especialmente en su bucle CD, originando las siguientes uniones: Ngb:fotollin-1 y Ngb:Gai. De este modo Ngb podría funcionar como un sensor del estrés oxidativo y generar una cadena de señales de transducción (15).

1.7.2 Neuroglobina: Vías oxidativas e hipoxia

La Ngb se encuentra sobreexpresada en la mitocondria donde tiene una función como molécula de transducción al activar mecanismos que eluden el déficit de energía y preservan la viabilidad de las células neuronales durante el estrés oxidativo (74). Además, la Ngb(II)-O₂ (oxyNgb) al tener una tasa de autoxidación alta, reacciona rápidamente con NO generando Ngb-III (metNgb) y nitrato. Es probable que durante la isquemia y la reperfusión, la Ngb(II)-O₂ reaccione con NO y ROS, evitando la formación de ROS muy tóxicas (18). Más aún, se ha observado que la sobreexpresión de Ngb cercana a la mitocondria tiene un papel en la disminución de la producción de ROS en neuronas expuestas a DOG (deprivación de oxígeno y glucosa), al interactuar con citocromo c, disminuyendo así la neurotoxicidad (60).

También se ha observado sobreexpresión neuronal de Ngb ante la hipoxia y bajo estas condiciones se encarga de regular el complejo de señalización Rho-GDI-GTPasa e inhibir la actividad de la cinasa 1 activada por p21 (Rac 1), suprimiendo así la polarización somal (75). En ratones expuesto a DOG, la sobreexpresión

neuronal de Ngb altera la expresión de genes de respuesta a hipoxia, lo cual podría producir un efecto neuroprotector (76).

1.7.3 Neuroglobina: Vías de supervivencia celular y apoptosis

La Ngb participa en una rápida reacción redox con citocromo c, tanto en células nerviosas como en células cancerosas no nerviosas (58, 77, 78). El citocromo c es una molécula que una vez liberada al citosol, es capaz de iniciar la apoptosis, se ha comprobado que la reacción redox entre Ngb y citocromo c es capaz de inhibir la activación de la caspasa 9, previniendo así la cascada apoptótica (79-81). Entonces, Ngb interviene en la vía apoptótica intrínseca corriente abajo de la mitocondria, al inactivar el citocromo y de este modo inhibir la formación del complejo apoptosoma (77, 79, 80). Las evidencias indican que sólo niveles endógenos altos de Ngb modifican la vía apoptótica, las concentraciones de Ngb tienen que ser tres veces mayores a las de citocromo c para que pueda ser restaurada la señal de activación apoptótica (79, 80).

Por otra parte, la unión de Ngb con VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje) a nivel mitocondrial, es considerado el mecanismo principal por el que ocurre la función antiapoptótica y de supervivencia en neuronas expuestas a DOG, lo cual se ha confirmado al observarse un aumento de la muerte neuronal apoptótica inducida por DOG en ratones en los que se ha bloqueado la expresión de Ngb (82).

1.7.4 Neuroglobina y ATP

Ante la sobreexpresión de Ngb se ha encontrado una disminución significativa en la expresión y el estado de fosforilación de la subunidad β reguladora de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). Esto es importante, ya que AMPK en su estado fosforilado es activa y estimula el catabolismo a la vez que inhibe el anabolismo. Lo anterior se ha comprobado en vivo, en cerebro y corazón de ratones transgénicos que sobreexpresan Ngb. Por lo tanto, Ngb tiene un papel en la regulación del

metabolismo energético, al inhibir la señalización de AMPK, promoviendo así la glucogénesis y la lipogénesis (83).

1.8 Neuroglobina y neurogénesis

La Ngb es una proteína expresada precozmente en la diferenciación neuronal, mediante análisis Western blot se ha encontrado expresión apenas detectable de Ngb en células madre embrionarias humanas (hESC, por sus siglas en inglés) y, por el contrario, es fácilmente detectable en células madre neuronales (CMNs). Más aún, neuronas con diferenciación adicional aumentaron ~50% la expresión de Ngb al compararse con los niveles de CMNs. Uno de los principales sitios de neurogénesis adulta es la región subventricular, mediante inmunotinción de esta región en ratas, se ha encontrado co-localización de Ngb con el marcador Dcx (doblecortina, un marcador de neuronas nacientes), pero no ocurrió lo mismo con marcadores celulares de mesénquima o astroglia, lo que es concordante con su expresión restringida a células de linaje neuronal (84-87).

La expresión de Ngb es edad-dependiente, ya que se ha demostrado disminución de la expresión de Ngb en roedores ancianos (24 meses de edad) comparado con roedores adultos jóvenes (3 meses de edad) (88). Mediante un modelo de hipoxia sistémica se demostró que la respuesta de Ngb a la hipoxia cambia en relación a la etapa de maduración neuronal y al grado de hipoxia, y que el aumento de Ngb mediado por hipoxia es dependiente de HIF (factor de transcripción inducible por hipoxia) (61). Otro estudio en ratones ha encontrado que las concentraciones de Ngb aumentan transitoriamente durante la maduración cerebral postnatal temprana y hasta aproximadamente el final de la segunda semana postnatal; durante esta etapa de desarrollo cerebral la Ngb se encuentra principalmente distribuida en el citoplasma de las neuronas y es posible que tenga un papel primordial en la regulación postnatal temprana del desarrollo cerebral. Es probable que las funciones de Ngb sobre vías mitocondriales mejoren la supervivencia celular temprana, la neurogénesis y finalmente la plasticidad cerebral (61, 80).

El crecimiento neurítico o neuritogénesis es esencial para el encuentro de vías neuronales y para la instauración de conexiones sinápticas durante el desarrollo del sistema nervioso central (89, 90). Se ha demostrado que expresión de niveles elevados de mRNA y proteína de Ngb en neuronas corticales primarias *in vitro* conduce al crecimiento neurítico debido a interacciones de Ngb con PTEN o Akt, por lo tanto, la presencia de Ngb es primordial para la neurogénesis o crecimiento neurítico (incluyendo axones) durante el desarrollo y/o diferenciación neuronal. Durante la etapa temprana de crecimiento axónico la Ngb se encuentra reunida en los conos de crecimiento axonal; la presencia de Ngb en neuritas de neuronas corticales e hipocampales de ratas adultas jóvenes también es relevante. En conjunto, estos hallazgos indican una asociación positiva entre Ngb y el desarrollo de neuritas/axones (91) (Fig. 7.).

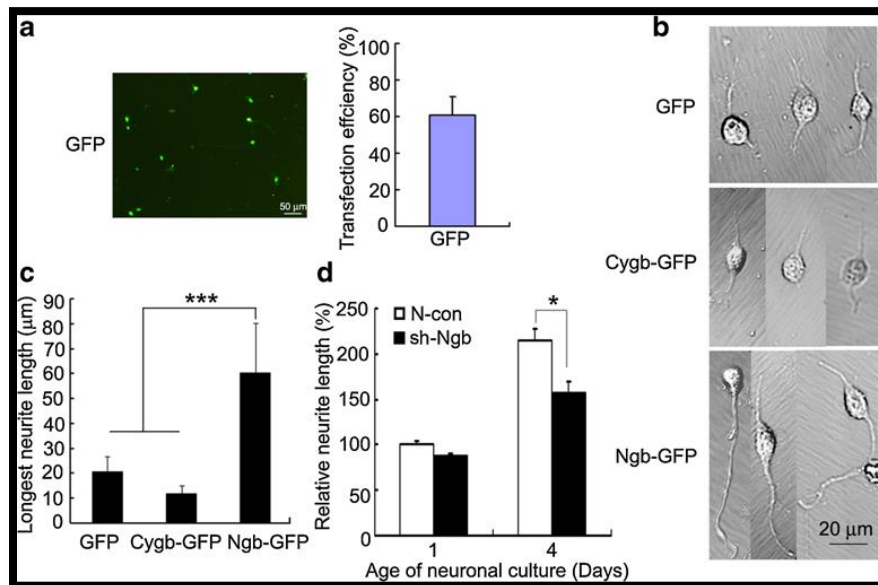


Fig. 7. Modificado de (91). Crecimiento axonal de neuronas corticales primarias afectado por la sobreexpresión o bloqueo de Ngb. A) Microfotografía 2 días posteriores a la transfección que demuestra la presencia de GFP en los cultivos y gráfica de eficiencia de la transfección. B) Micrografía demuestra que la sobreexpresión de Ngb altera el crecimiento axonal en neuronas corticales al 3 DIV. C) Análisis estadístico demuestra que las neuritas con la longitud más larga fueron las neuronas transfectadas con Ngb al 3 DIV. D) Análisis estadístico demuestra que ante bloqueo de Ngb en transfectos sh-Ngb (plásmido eliminador de Ngb) la neurita con mayor longitud fue significativamente más corta que en transfectos control al 4 DIV. DIV, (días *in vitro*); GFP (proteína fluorescente verde).

A través de expresión ectópica de Ngb se comprobó que las concentraciones aumentadas de Ngb facilitan el crecimiento neurítico tanto de células N2a (Neuro2a) como de neuronas corticales primarias y, por el contrario, las concentraciones disminuidas de Ngb mostraron una deficiencia neurítica prominente o un fenotipo de crecimiento retardado. Entonces, la Ngb actúa como un regulador importante de la maquinaria encargada del desarrollo y crecimiento neurítico (91). La sobreexpresión de Ngb a través de Lentivirus, ha demostrado que Ngb promueve la neurogénesis, al aumentar la proliferación y diferenciación de células neuronales progenitoras cultivadas (NPC, por sus siglas en inglés), es posible que este efecto pro-neurogénico de la sobreexpresión de Ngb esté mediado por una regulación al alza de Dvl1 (proteína de polaridad de segmento desaliñado 1), un efector de la vía de señalización Wnt (92).

El sevoflurano es un anestésico general que se ha relacionado con neurotoxicidad en cerebros en desarrollo (93, 94). La administración de hemina, un inductor de Ngb (95), en ratas expuestas a sevoflurano durante el embarazo tardío, incrementó la expresión de Ngb en el hipocampo de sus crías. El aumento de Ngb en estas crías consiguió una disminución de la apoptosis inducida por sevoflurano, un incremento de la expresión de Hif-1 α , un decremento del daño en el aprendizaje a largo plazo y en la memoria causado por sevoflurano y aumento en el número de neuronas hipocampales. Por lo tanto, es posible que el daño nervioso causado por sevoflurano este asociado a una expresión disminuida de Ngb y que la Ngb inhiba los efectos perjudiciales sobre la neurogénesis causados por exposición prenatal a sevoflurano (96).

1.9 Hierro como metal divalente

El hierro es un micronutriente con cualidades únicas, en su forma divalente o ferrosa (Fe²⁺) puede donar electrones, en tanto que, su forma trivalente o férrica (Fe³⁺) puede aceptarlos. Esto es una característica esencial para su función como transportador de oxígeno, sin embargo, también puede tener potencial toxigénico al poder generar radicales libres. Sin embargo, existen proteínas en el cuerpo humano

que se unen al hierro y lo detoxifican (97). El hierro también cumple muchas otras funciones como: eritropoyesis, transporte y almacenamiento de oxígeno, funciones mitocondriales, síntesis y degradación de proteínas, lípidos y ácidos ribonucleicos; metabolismo del músculo cardíaco y esquelético, funciones en la glándula tiroides, sistema nervioso central y sistema inmune (98).

1.10 Metabolismo del hierro

Un adulto bien nutrido contiene un total de 3-5 g de hierro en el cuerpo, con casi 60% incluidos en la hemoglobina y 10% en mioglobina del músculo. El resto del hierro se encuentra almacenado en varios tipos de células como los hepatocitos o los macrófagos reticuloendoteliales, en estas células el hierro se almacena al unirse a ferritina. A través de la ferritina un hombre sano almacena 800-1000 mg de hierro y una mujer 300-500 mg, éstas reservas de hierro unido a ferritina son suficientes para mantener la función por 3 años en hombres y 6 meses en mujeres si existiera un rango diario normal de pérdida de hierro (aprox. 1-2 mg/día) (97, 99).

En el mundo occidental una dieta típica contiene 5-6 mg de hierro por cada 1,000 kcal, siendo el 90% hierro no hemo, el cual a su vez es integrado en su mayoría por hierro férrico o Fe^{3+} . Sin embargo, el hierro férrico (Fe^{3+}) no es absorbido tan bien como el hierro ferroso (Fe^{2+}), este último es posible encontrarlo hasta en la mitad del contenido de hierro de alimentos como son: la carne, el pescado o las aves de corral (100).

En naciones en desarrollo el consumo promedio diario de hierro se encuentra entre 12-15 mg y de los cuales sólo se absorben 1-2 mg, lo cual equivale a la cantidad de hierro perdido diariamente por la sangre, piel, orina y mucosa del intestino (100, 101). Para resacir estas pérdidas, el cuerpo requiere absorber 1-2 mg de hierro por día, no obstante, la síntesis de Hg por sí sólo necesita de 20-25 mg diarios de hierro. Por lo tanto, para sustentar la síntesis de Hg y otros procesos metabólicos, es forzoso que el hierro sea reciclado y se encuentre estrechamente regulado (99).

1.10.1 Absorción del hierro

El hierro es absorbido en los enterocitos duodenales, para lo cual es necesario la ferrireductasa Cybrd 1 (DcytB) quien reduce el hierro férrico (Fe^{3+}) no hemo a hierro ferroso (Fe^{2+}), para que pueda ser transportado a través de la membrana celular por el transportador de metales divalentes 1, DMT1 (SLC11A2) (102-106). La ferritina es una proteína que oxida y almacena el exceso intracelular de hierro ferroso, en un núcleo mineral de ferrihidrita (107, 108).

En los enterocitos el hierro que es secuestrado en forma de ferritina se pierde a los pocos días debido al desprendimiento de las células epiteliales intestinales. Por lo tanto, el exportador basolateral de hierro llamado ferroportina (Fpn, SLC40A1) se encarga de transportar el hierro desde el citosol al plasma (109-111). Una vez en el plasma, el Fe^{3+} circula unido a transferrina (Tf), una glicoproteína que posee dos sitios de unión para hierro férrico, manteniéndolo así en una forma soluble (112). De esta manera, la transferrina limita formación de radicales tóxicos y libera el hierro a otras células. Las concentraciones plasmáticas de hierro en una adulto varían entre 14-32 $\mu\text{mol/L}$ con prácticamente todo circulando unido a Tf, por lo que en personas sanas la Tf se encuentra saturada por hierro en aprox. 33.3% (113).

1.10.2 Hierro: Uso, reciclaje y almacenamiento

El hierro es principalmente usado por la médula ósea eritroide, donde la mayoría del hierro proviene del reciclaje interno mediado por macrófagos tisulares, predominantemente macrófagos esplénicos. Los eritroblastos adquieren hierro a través de una proteína expresada en su superficie celular, el receptor de transferrina 1 (TfR1). Así, una vez que el TfR1 se une a transferrina cargada con hierro (Holo-Tf), se endocita este complejo y es llevado a endocitos acidificados, ahí, el hierro es dissociado de la transferrina por la acción de la proteína seis transmembrana antígeno epitelial de la próstata (STEAP), para después salir del endosoma vía DMT1 (114). Después, la transferrina y el receptor de transferrina son reciclados a la superficie celular; el hierro por su parte, es llevado de los compartimientos

intracelulares a la mitocondria a través de la proteína de membrana interna (mitoferrina 1). La mitocondria es el compartimento intracelular donde se hace uso de la mayor parte del hierro, ya que en este organelo se usa para la síntesis de hemo y grupos prostéticos (115).

Una vez sintetizado el hemo dentro de la mitocondria es exportado hacia citosol donde se integra a proteínas para formar Hg principalmente (116, 117). El resto de hierro que no es utilizado se almacena en la proteína ferritina, una sola molécula de ferritina puede acumular hasta 4500 átomos de hierro. Por lo tanto, la ferritina es crucial para prevenir el daño celular mediado por hierro al mantener el exceso del mismo en un forma no reactiva, y así, no se favorece la formación de radicales libres de oxígeno (108).

Los macrófagos son capaces de recapturar hierro al fagocitar eritrocitos dañados o senescentes, para después catabolizar el hemo a través de la hemoxigenasa y liberar así al hierro. Más tarde, este hierro es transportado al plasma por el exportador de hierro ferroportina y aquel que no es utilizado se almacena en la ferritina de los macrófagos (98, 113, 118). Además de los macrófagos existe otro almacén mayor de hierro no unido a transferrina, el hígado, donde a través de ferritina secuestra hierro para poder movilizarlo cuando sea requerido por el cuerpo (119-121).

1.10.3 Regulación sistémica de hierro

La hepcidina es una hormona peptídica producida por el hígado y es clave en regulación sistémica del hierro. Los estímulos fisiológicos que afectan la homeostasis de hierro como sobrecarga de hierro, inflamación, deficiencia de hierro, actividad eritropoyética e hipoxia, tienen la capacidad de modificar los niveles de hepcidina. Esta hormona actúa al unirse a ferroportina, provocando su internalización y degradación en lisosomas, de esta manera logra inhibir la liberación del hierro al plasma desde los enterocitos duodenales, macrófagos y hepatocitos. Por lo tanto, niveles bajos de hepcidina aumentan los niveles séricos

de hierro y niveles altos de hepcidina reducen los niveles séricos de hierro, logrando de esta manera regular la saturación de Tf (122-124).

1.10.4 Regulación intracelular del hierro

El hierro intracelular también se encuentra regulado meticulosamente, ya que el hierro libre puede ser tóxico al contribuir a la formación de radicales hidroxilo (99). Las proteínas reguladoras de hierro IRP1 (ACO1) y IRP2 (IREB2) regulan postranscripcionalmente la homeostasis intracelular del hierro en respuesta a cambios citoplasmáticos en las concentraciones de hierro. Si los niveles intracelulares de hierro son bajos, las proteínas reguladoras del hierro (IRPs) inhiben la traducción de ferritina y ferroportina, a la vez que estimulan la estabilización del ARNm del TfR1. En conjunto, los cambios anteriores ocasionan un aumento en los niveles de hierro citoplasmático. Por el contrario, si las células están repletas de hierro, la IRPs son degradadas o incapaces de unirse a sus sitios de acción, logrando así la disminución de los niveles de hierro citoplasmático (125, 126).

1.11 Metabolismo del hierro en fetos e infantes

Durante el embarazo, la placenta es la encargada de normalizar el intercambio de hierro entre la madre y el feto. A partir de la trigésima semana de gestación la madre transfiere la mayor cantidad de hierro desde la circulación materna al feto, hecho que concuerda con el incremento de la absorción materna de hierro. El intercambio de hierro sérico materno a través de la placenta es facilitado por los receptores de transferrina de la placenta. Posteriormente, el hierro penetra a la parte fetal de la placenta para después ingresar en la circulación fetal unido a la ferritina fetal. La densidad de receptores placentarios de transferrina es incrementada en caso de concentraciones bajas de hierro materno, mientras que la ferritina placentaria tal vez impidan el transporte excesivo de hierro al feto (127). Además, los niveles séricos de ferritina en el cordón umbilical aumentan de acuerdo al avance de la edad

gestacional durante el segundo y tercer trimestres (128). Para los infantes, la principal fuente del hierro no hemo la constituye el hierro unido a las proteínas de la leche y a otras sustancias de bajo peso molecular (129).

1.12 Deficiencia de hierro

Cuando la cantidad de hierro absorbida de la dieta sobrepasa la demanda requerida por el cuerpo, aparece la deficiencia de hierro (DFe) (130). A nivel mundial la DFe es un desorden alimenticio extremadamente común que aqueja a más de dos billones de personas y es la principal causa de anemia (131-133). Afecta particularmente a infantes, niños pequeños, adolescentes, adultos mayores, aquellos con enfermedades inflamatorias crónicas, y mujeres, en éstas la menstruación y el embarazo son factores de riesgo adicionales. Aprox. un 30-40% de mujeres y niños preescolares de países industrializados son afectados por la DFe, por otro lado, casi todos los individuos de estos grupos son afectados en países en desarrollo (134).

Existen incrementos de las necesidades nutricionales de hierro de acuerdo al sexo y en etapas específicas de la vida. En ausencia de suplementación alimenticia, la DFe es reportada en alrededor de 40% de niños preescolares, en 30% de mujeres y niñas que menstrúan, y en 38% de mujeres embarazadas. (133, 135, 136). Las causas de DFe en países en desarrollo típicamente son: consumo dietético insuficiente y/o pérdida sanguínea intestinal debida a colonización por parásitos. En cambio, en países con ingresos altos, las principales causas son: ciertos hábitos alimenticios (dieta vegana o no consumir carne roja) y ciertas condiciones patológicas (pérdidas sanguíneas crónicas o malabsorción) (133).

1.12.1 Deficiencia de hierro en etapas tempranas de la vida

1.12.1.1 Prevalencia de la deficiencia de hierro durante la vida temprana

La DFe es por mucho la más frecuente deficiencia de un micronutriente, se estima que 50% de las anemias son debidas a esta causa. La prevalencia exacta de la DFe es muy difícil de calcular durante los primeros 2 años de vida debido al dinamismo del hierro durante este período (137).

1.12.1.2 Etapas de riesgo para el desarrollo de la deficiencia de hierro durante la vida temprana

Las tres etapas con más riesgo para el desarrollo de DFe durante la infancia son: la etapa prenatal tardía y el período neonatal, entre los 6-24 meses de edad y la adolescencia (138-140).

1.12.1.2.1 Deficiencia de hierro durante el desarrollo fetal

El hierro es obtenido por el feto a través de la placenta, ocurriendo el 80% de la transferencia durante el tercer trimestre del embarazo, es esencial que el feto adquiera reservas adecuadas de hierro de la madre para mantener su crecimiento durante los primeros 6 meses de vida, ya que el hierro proporcionado por la alimentación al seno materno es muy bajo (141). A lo largo del embarazo la prevalencia de la DFe es alta; 43% de las mujeres embarazadas a nivel mundial presentan anemia, siendo la DFe la causa en 50-75% de los casos lo que parece deberse a un aumento de los requerimientos nutricionales y a una dieta inadecuada durante el embarazo (142). Incluso, a nivel mundial la causa más común de DFe durante el período gestacional y la etapa postnatal temprana es la DFe materna (143). Otras causas de DFe durante el período fetal y neonatal son: nacimiento pretérmino y complicaciones gestacionales (diabetes materna, restricción del

crecimiento intrauterino, tabaquismo materno, obesidad materna e inflamación) (138-140).

1.12.1.2.2 Deficiencia de hierro durante el período neonatal y la infancia temprana

En los infantes hay 3 fuentes dietéticas de hierro: leche materna (con el hierro unido a lactoferrina), hierro hemo y hierro no hemo. Para los neonatos y los infantes pequeños su única fuente de hierro se encuentra en la leche materna y/o la fórmula (144). Al nacer la mayoría de los infantes a término presentan concentraciones normales a altas de Hb (15-17 g/dL), por lo que permanecen saturados de hierro hasta los 6 meses de vida. Los bebés de madres con DFe, presentan un riesgo elevado de desarrollarla aproximadamente a los 4-6 meses de edad, sin ser manifestada al nacimiento (145). Los infantes prematuros también son más proclives a la DFe (146), quizá porque sus intestinos son inmaduros y no pueden absorber el hierro hasta los 6-9 meses de edad (147).

La leche materna contiene una concentración muy baja de hierro e incluso esta concentración disminuye pasados algunos meses del posparto (144) y, a pesar de que el hierro de la leche materna tiene una biodisponibilidad muy alta de ~50% comparado con 3-4% de la fórmula para infantes (148), los niños con alimentación única al seno materno por más de doce meses son especialmente susceptibles a desarrollar DFe (149). Por otra parte, durante el período postnatal el consumo de una dieta baja en hierro o con aglutinantes de hierro así como la pérdida sanguínea crónica por intolerancia a la leche de vaca o por infestación de anquilostomas, son causas comunes de DFe (138-140).

1.12.1.2.3 Deficiencia de hierro durante la niñez

Durante esta etapa el hierro se adquiere completamente de la dieta, contrario a los adultos, en quienes la dieta tan sólo aporta 5% de las necesidades diarias. Los infantes y niños obtienen el 30% de sus requerimientos diarios a través de la dieta,

debido a que necesitan solventar las necesidades de hierro para la formación de nuevas células rojas y musculares (150). Por lo tanto, en niños la DFe es la deficiencia más común de un micronutriente (133, 151). En la dieta, el hierro hemo es la forma de hierro con mayor biodisponibilidad y se puede encontrar en carne, aves de corral y pescado. El hierro no hemo es otra fuente de hierro y se puede encontrar en vegetales (particularmente espinacas, lentejas y semillas de calabaza), cereales fortificados (152), frijoles y nueces (153). Tanto países industrializados como en desarrollo la anemia por DFe es uno de los desórdenes hematológicos más frecuentes en la infancia temprana (154, 155) y la probabilidad de desarrollarla aumenta en niños provenientes de familias con bajos ingresos (156).

1.12.2 Deficiencia de hierro y efectos adversos en el neurodesarrollo

El cerebro fetal y post-natal temprano posee un mayor requerimiento de hierro que el cerebro maduro (157). Además, el transporte de hierro a través de la barrera hematoencefálica se encuentra estrechamente regulado e incluso se ha encontrado la presencia del receptor de transferrina 1 (TfR1) en las células endoteliales de los capilares cerebrales (158). La DFe temprana (período perinatal tardío a primeros 24 de edad) coincide con el período de rápido desarrollo y crecimiento cerebral, provocando alteraciones neurológicas crónicas e irreversibles. Incluso, la DFe durante el embarazo tardío y la post-natalidad temprana son factores de riesgo mayores para el desarrollo de anomalías a largo plazo sobre el neurodesarrollo. Por otra parte, es probable que el cerebro de adolescentes y mayores de edad se encuentre totalmente desarrollado, así la DFe en estas etapas conduce a alteraciones neurológicas que son reversibles con suplementación de hierro (138-140).

Uno de los mayores problemas no hematológicos relacionados con la DFe, son las perturbaciones conductuales y cognitivas, cuyos mecanismos subyacentes implican mielinización disfuncional, alteración de la neurotransmisión y deficiente desarrollo cerebral. Los infantes con DFe son particularmente proclives a padecer de problemas cognitivos, así como disfunción auditiva y visual (159). Por desgracia, los

problemas anteriores aparecen en la infancia temprana, etapa en la que dopamina es el principal neurotransmisor, por lo que resulta incierta la prevención de estas alteraciones mediante suplementación tardía de hierro (159, 160).

Durante la infancia la DFe conlleva a varias alteraciones en el neurodesarrollo como perturbaciones en la función motora, ansiedad, defectos cognitivos, y defectos psiquiátricos. La fisiopatología de estas alteraciones, es compleja y comprende mielinización disfuncional, alteraciones en la dendritogénesis y sinaptogénesis, alteraciones en neurotransmisores y vías endocrinas (161).

Las evidencias más fuertes con respecto a las alteraciones neurológicas provienen de estudios sobre la cognición realizados en niños de edad escolar y adolescentes con DFe y anemia por DFe (162). En niños mayores y adultos se ha demostrado mejoría posterior a la suplementación de hierro en los dominios cognitivos de concentración, inteligencia, memoria, habilidades psicomotoras y rendimiento escolar (163). Tanto niños como infantes DFe, presentan una disminución del desarrollo psicomotor y mental, estos efectos varían de acuerdo a la duración, grado y etapa en la que se presenta la DFe, ya que cada área del cerebro presenta una velocidad y etapa de desarrollo específicos (164).

Durante el último trimestre del embarazo, existe una acelerada mielinización y desarrollo del estriado y el hipocampo. Por su parte, los niños entre 6 meses y 3 años de edad exhiben una mielinización y desarrollo rápido de la corteza frontal y los ganglios basales (encargados del control motor) (165). La DFe durante el embarazo tardío y el período neonatal provoca en infantes de término alteraciones en el temperamento (166), memoria de reconocimiento anormal (167, 168) así como deficiencias mentales y psicomotoras (169), por otra parte, en los infantes pretérmino se relaciona con reflejos neurológicos (170) y respuesta del tronco encefálico alterada (171). Durante la post-natalidad (6-24 meses) la DFe se relaciona con IQ (cociente intelectual) bajo, velocidad de procesamiento baja, trastornos en el ritmo circadiano y, déficits en la atención, la motricidad, la cognición y la conducta (172). Las alteraciones cerebrales causadas por DFe pueden dañar permanentemente el cerebro y el sistema nervioso, observándose poca corrección

de estas alteraciones en niños pequeños sometidos a suplementación con hierro (139, 173-175).

En general, las alteraciones deletéreas de la DFe sobre el cerebro se han atribuido a la disminuida incorporación del hierro a hemoproteínas (Hb o citocromos) o a proteínas con grupos hierro-sulfuro (176). Hasta antes de la década de 1970 las alteraciones neurológicas de la DFe eran atribuidas principalmente a causa de la anemia y en consecuencia efectos sobre la oxigenación cerebral y metabolismo cerebral. Sin embargo, ha quedado demostrado que la DFe tiene efectos independientes a la anemia sobre los tejidos cerebrales. Se ha propuesto que los niveles tisulares reducidos de hierro en el cerebro alteran el metabolismo energético al disminuir los citocromos, provocando un deficiente transporte de electrones y generación de ATP (177). Esta propuesta es respaldada al encontrarse decrementos localizados principalmente en hipocampo y corteza prefrontal de citocromo c oxidasa, un marcador neuronal del estado energético (178). Más aún, estudios con resonancia magnética espectroscópica secuencial en roedores vivos deficientes en hierro, han demostrado anormalidades agudas y crónicas del metabolismo energético en hipocampo y estriado (179, 180).

Otro mecanismo neuropatológico observado ante DFe es la alteración cerebral de las concentraciones de ácidos grasos, lo que se piensa es causado por el compromiso de enzimas contenedoras de hierro necesarias para la conversión de éstos en mielina (181, 182). La DFe temprana también conduce a alteraciones de la expresión génica cerebral de proteínas relacionadas con la mielinización, la morfología dendrítica, el neuro-metabolismo y la energía celular (183), particularmente en el hipocampo (184). Por lo tanto, en el cerebro el hierro y las enzimas que contienen hierro son necesarias para el metabolismo energético neuronal y glial, la síntesis de mielina y la neurotransmisión (185).

1.12.2.1 Manifestaciones neurológicas y psiquiátricas de la deficiencia de hierro

De acuerdo a estudios clínicos, los fetos y los neonatos que padecen anemia por DFe son aquejados negativamente en su comportamiento, lo cual comprende daño en la maduración motora, la respuesta autonómica, la memoria/aprendizaje y el carácter (186-188). Asimismo, la DFe está relacionada con varios desórdenes psiquiátricos y del neurodesarrollo como el TDAH (Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad) y el TEA (Trastorno del Espectro Autista), este último hasta en un tercio (189-191). Problemas motores también están relacionados con DFe y al parecer se instalan tempranamente durante infancia (192, 193).

Un número progresivo de estudios señalan a la DFe como un factor mayor que afecta la cognición (194, 195), e incluso adultos mayores son afectados (196). También se ha demostrado alteración en los patrones del sueño en infantes afectados por DFe y al reducirse la cantidad de sueño se tiene un impacto negativo en la formación de la memoria y en la regulación de la actividad motora, además, no se provee de las condiciones necesarias para la modificación plástica que ocurre durante el sueño. Estas alteraciones parecen persistir a pesar de la corrección de la DFe (197, 198).

1.12.2.2 Efectos de la deficiencia de hierro sobre la mielinización

En las ratas se ha observado que la DFe conlleva a niveles reducidos de mielinización y, a una escasez de proteínas y lípidos de la mielina (199, 200). La mielinización se desarrolla con rapidez durante el embarazo y la infancia temprana (182, 201), y ya que el máximo período de mielinización se relaciona con el período de máxima absorción de hierro por el cerebro, se ha sugerido que el hierro constituye un factor importante durante el proceso de mielinización neuronal y que es necesario para gliogénesis cerebral normal (202).

Se especula que la DFe conlleva a un número menor de células oligodendrogiales y menor formación de mielina (203). Además, la DFe también es responsable de un

incremento en la células indiferenciadas y proliferantes del cuerpo calloso. Normalmente los oligodendrocitos almacenan hierro cuando es momento de producir mielina (157), por lo que se ha sugerido que los oligodendrocitos de las generaciones primarias son formados con la ayuda del hierro (204). Más aún, se demostrado que el hierro interfiere en la composición de la mielina (205) y que el número de oligodendrocitos determina las concentraciones de transferrina y mRNA de transferrina en el sistema nervioso central (206, 207).

Las perturbaciones en el proceso de mielinización debidas a DFe se han relacionado con alteraciones duraderas sobre el tronco encefálico auditivo y los potenciales evocados visuales (PEV) (159), los cuales parecen mielinizarse rápidamente en presencia de DFe, ocasionando una reducción de su mielinización (208). Esta hipomielinización afecta particularmente a los niños, condicionando una respuesta reducida del tronco encefálico auditivo y PEV (159). Un estudio experimental hecho en ratas perinatales DFe, ha mostrado deterioro del reconocimiento visual secundario a mielinización anormal de la sustancia blanca subcortical (209).

1.12.2.3 Efectos de la deficiencia de hierro sobre la dendritogénesis y la sinaptogénesis (plasticidad sináptica)

El crecimiento del hipocampo es un suceso primordial para el feto y ocurre a etapas tempranas de la vida y hasta aproximadamente los 2 años en humanos (210), para que esto ocurra la dendritogénesis y la sinaptogénesis son procesos de vital importancia (211, 212). Tanto en el período prenatal como en el neonatal, la DFe y/o la hipoxia son capaces de producir efectos tóxicos sobre el cerebro en desarrollo, afectando así la morfología dendrítica, lo cual a su vez dificulta la sinapsis neuronal (213, 214).

La DFe neonatal/fetal reduce la longitud del eje apical de la región CA1 del hipocampo, lo cual persiste aún en la adultez a pesar de la repleción de hierro. Esta alteración en el hipocampo ocasiona alteraciones cognitivas, ya que durante el período perinatal las neuronas del hipocampo modifican el circuito involucrado en el

procesamiento de la cognición, este proceso coincide con la regulación a la alta de la Tf sugiriendo así una participación importante del hierro (215).

1.12.2.4 Deficiencia de hierro y alteraciones en neurotransmisores (señalización monoaminérgica)

El perfil neuroquímico de hipocampo de ratas alimentadas con dieta baja en hierro se encuentra significativamente alterado, con concentraciones de creatinina, lactato, taurina y glutamato disminuidos y el nivel de glutamina incrementado (216). Otros estudios han demostrado resultados similares en el estriado (180). Como se observa en ratas sometidas a hipoxia crónica, las alteraciones en los niveles de creatinina pueden deberse a una anemia severa consecuencia de DFe (217). Los niveles bajos de lactato y taurina indican un decremento en el metabolismo oxidativo de la glucosa, lo cual probablemente esté relacionado con una disminución en la función de las enzimas encargadas de la fosforilación oxidativa, que contienen hierro (218). El incremento de los niveles de glutamina advierten afección del ciclo glutamato/glutamina en neuronas y glia hipocampales de ratas expuestas a DFe, lo que también es concordante con las concentraciones reducidas de taurina (219). Es probable que este perfil neuroquímico alterado, consecuencia de la DFe, ocasione modificaciones en el metabolismo monoaminérgico (172).

Estudios en animales con DFe han evidenciado alteraciones en el comportamiento como consecuencia de cambios en la homeostasis de dopamina, encontrándose en el estriado concentraciones elevadas de dopamina extracelular, así como una disminución de receptores y transportadores de dopamina, lo cual seguramente tiene un impacto negativo severo sobre el estriado, el núcleo accumbens y la corteza prefrontal (199, 220-222). Las alteraciones descritas anteriormente quizá expliquen parcialmente los problemas de atención observados en niños DFe (199, 223, 224). En el área prefrontal y el hipocampo, el sistema glutaminérgico también se encuentra afectado por la DFe, y quizá sea responsable de los cambios antes mencionados a nivel dopaminérgico (225).

En ratones endogámicos recombinantes la DFe parece afectar en el mesencéfalo la expresión de genes asociados a dopamina como son Cxcl12 (factor derivado de célula 1) y Hbb-b1 (cadena β de hemoglobina adulta 1). Siendo posible que estos genes modulen el hierro y la función de neuronas dopaminérgicas (226, 227), es probable que afecten negativamente el estado emocional del feto y lo predispongan a un comportamiento ansioso más tarde en la vida (228).

En ratas alimentadas con dietas DFe desde el destete hasta la edad adulta, otros neurotransmisores afectados por la DFe son serotonina (5HT) y norepinefrina (NE), lo cual es consecuencia de reducciones en los neurotransportadores de 5HT y NE en regiones cerebrales como el núcleo accumbens, caudado, putamen, sustancia negra e hipocampo (229-231). La plasticidad sináptica probablemente sea afectada por estas alteraciones en el sistema noradrenérgico, lo que se ha relacionado con dificultades en el aprendizaje a la edad adulta (231).

1.12.2.5 Deficiencia de hierro y efectos neuroendócrinos

Otro hallazgo interesante observado en ratas con DFe perinatal, es un incremento de las concentraciones basales de la corticoesterona a los 29-30 días postnatales, dicho aumento es corregido después de un mes de suplementación con hierro (232). Además, los niños con DFe durante el primer año de vida se han asociado con efectos neuroendócrinos sobre la secreción de cortisol posterior a estímulos estresantes (233). Por otra parte, estudios experimentales en animales y estudios clínicos observacionales en sujetos DFe han demostrado concentraciones séricas alteradas de prolactina, lo que parece correlacionarse con un comportamiento anormal, incluyendo ser inusualmente vacilante e infeliz durante la evaluación de su desarrollo (172, 234-236).

1.13 Áreas cerebrales más afectadas por deficiencia de hierro

1.13.1 Deficiencia de hierro e hipocampo

Como en el humano, el hipocampo de las ratas madura en el período fetal tardío y se hace funcional en las etapas neonatales tempranas (237). Durante los días postnatales (P) 5-15, justo antes al período de maduración neuronal rápida del hipocampo (212), aumenta la expresión génica y proteica de dos proteínas reactivas a hierro (TfR-1 y DMT-1) en el hipocampo (184, 238). Además, la restricción dietética de hierro desde inicios de la gestación puede ocasionar una disminución de hierro en el hipocampo de hasta 50% para el día postnatal 10, lo cual es muy aproximado a lo ocurrido en humanos nacidos a término (237). Es por esto que hipocampo representa un área altamente vulnerable a la DFe durante el período perinatal (239), esta área se encuentra relacionada con el aprendizaje y la memoria, tanto en humanos como en roedores (240). Más aún, es bien conocido que la memoria dependiente del hipocampo (memoria de reconocimiento y miedo condicionado) se ven afectadas por la DFe (139).

A través un modelo neuronal específico de DFe en hipocampo en ratón no anémico, se ha demostrado que la DFe crónica sin anemia sobre el hipocampo resulta en expresión alterada de ~1.5% del transcriptoma hipocampal adulto, lo que conlleva a alteraciones en vías necesarias para el neurodesarrollo y la plasticidad (241). Durante la etapa postnatal temprana de ratas, la anemia por DFe provoca ramificaciones dendríticas basales y apicales aberrantes así como espinas más delgadas en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo (213, 242) (Fig. 8.). Más aún, cuando estas ratas son adultas, las neuronas piramidales de la región CA1 poseen ramificaciones más cortas y disminución de la ramificación distal a pesar de la reposición neonatal de hierro, sugiriendo que las alteraciones en la estructura neuronal secundarias a anemia por DFe son persistentes a lo largo del tiempo (213). Las alteraciones anteriores se manifiestan electrofisiológicamente con una menor LTP (expresión de potenciación a largo plazo) (215), deficiente

rendimiento en pruebas de memoria/aprendizaje espacial y de reconocimiento, lo cual es un indicio de disfunción sináptica (222, 243).

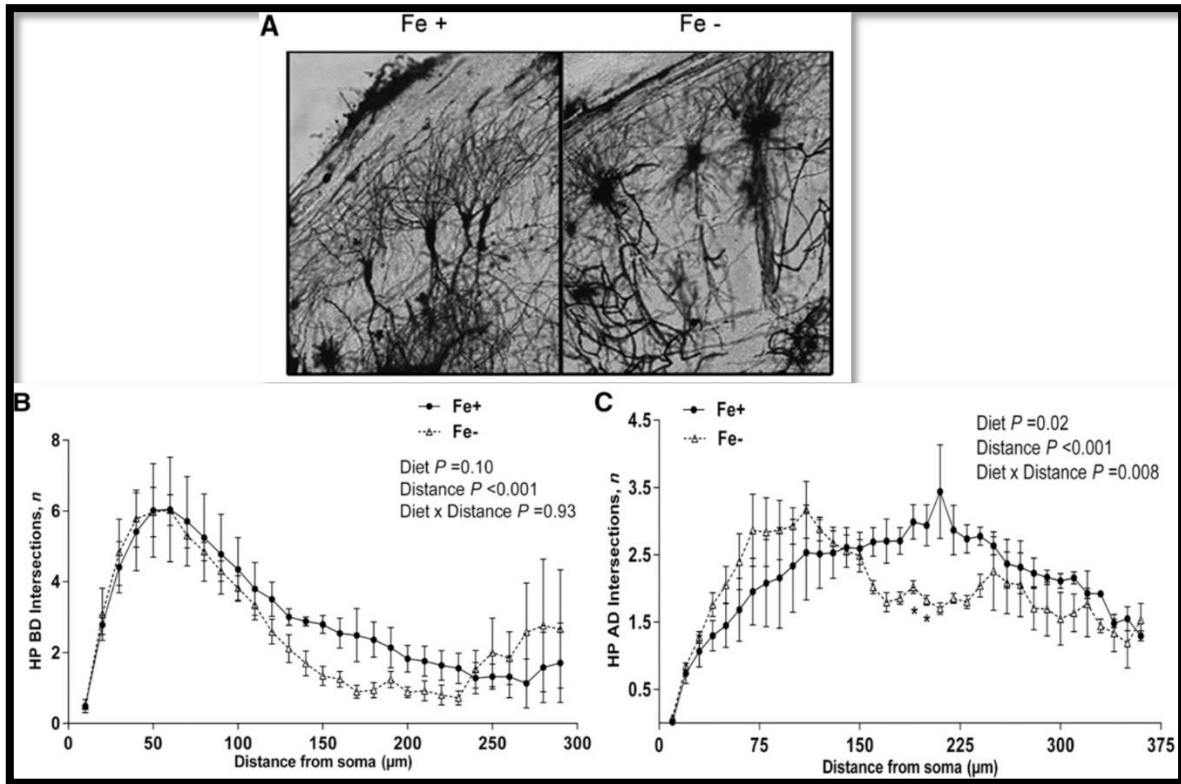


Fig. 8. Modificado de (242). Tinción de Golgi para evaluar la complejidad de ramificación dendrítica en HP de ratas Fe+ y Fe- P21. (A) Imágenes de neuronas piramidales de sección HP CA1 en Fe+ y Fe-. (B) Número de intersecciones de anillo Sholl en neuronas HP CA1 de ratas Fe+ y Fe- tanto en BD (B) como AD (C). La longitud de las BD fue significativamente más corta en neuronas piramidales CA1 Fe- que en Fe+. Así como el análisis Sholl de las intersecciones en anillo demostró efectos significativos en la complejidad de las AD, p. ej., el número de intersecciones en las AD a una distancia de 200-210 μm fue ~50% menor en Fe- a comparación de Fe+. AD, dendrita apical; BD, dendrita basal; Fe +, control de hierro; Fe-, deficiente en hierro; HP, hipocampo; P21, día postnatal 21, * diferencias estadísticamente significativas.

Modelos genéticos de ratones con DFe neuronal-específica en hipocampo durante la vida temprana, se caracterizan por alteraciones estructurales en neuronas piramidales CA1, disminución de LTP y deficiencias en el aprendizaje/memoria espacial en la adultez; es posible que estas alteraciones se deban a los niveles reducidos de hierro en las neuronas piramidales CA1, provocando cambios a largo

plazo en la estructura y función estas neuronas (244-246). Al evaluar la expresión de MAP-2 (proteína asociada a los microtúbulos), una proteína relevante para el armazón dendrítico, se ha encontrado que la DFe durante el período perinatal provoca alteraciones en el desarrollo estructural dendrítico en la región CA1 del hipocampo (214), lo que puede ser ocasionado por un inadecuado aporte energético durante el crecimiento dendrítico o por un efecto directo sobre la expresión del gen MAP-2 (183) (Fig. 9.).

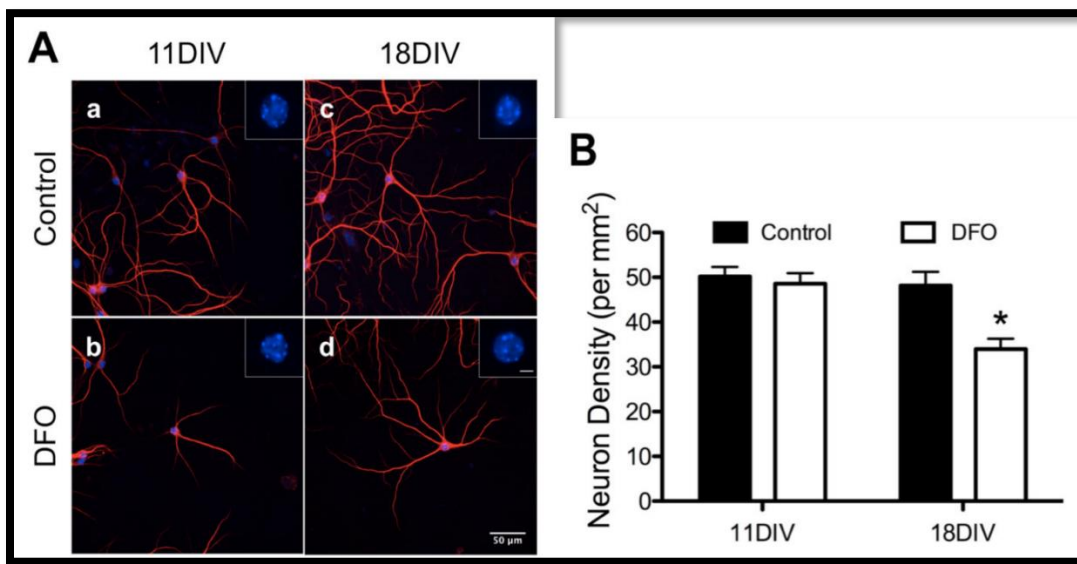


Fig. 9. Modificado de (247). Efectos de la exposición neuronal a DFe. Cultivo de neuronas de hipocampo de ratón las cuales fueron expuestas a DFO (deferroxamina, un quelante de hierro). Los cultivos fueron fijados y teñidos a los 11 y 18 DIV (días *in vitro*), los núcleos se teñieron con DAPI y las dendritas con MAP2. A) Imágenes cultivos neuronales al 11 DIV (a, b) y 18 DIV (c, d), con exposición a 0 μ M (a, c) y a 10 μ M (b, d) de DFO. B) Diferencias entre densidad neuronal. * diferencias estadísticamente significativas.

El uso crónico de deferroxamina (DFO, un quelante de hierro) en cultivos de neuronas hipocampales embriónicas iniciando a los 3 días *in vitro* (DIV) provoca una DFe similar a la observada en roedores, bajo estas condiciones se han demostrado concentraciones aumentadas de mRNA de proteínas involucradas en la captura de hierro en el 11 y 18 DIV. Por otra parte, el uso de DFO disminuyó las concentraciones de mRNA de genes que generan desarrollo dendrítico y sináptico

y que producen la función mitocondrial. Además, en el 18 DIV, DFO logró disminuir el metabolismo energético incluyendo: respiración basal, respiración máxima, capacidad respiratoria de reserva, producción de ATP, y la tasa, capacidad y reserva glucolítica (247).

Este mismo modelo de DFe neuronal específico en hipocampo también demostró disminución en la complejidad dendrítica distal a los 11 y 18 DIV. Tanto la longitud de dendritas primarias como el número y la longitud de las ramificaciones se vio disminuido en el 11 DIV en neuronas tratadas con DFO. Para el 18 DIV se presentó una recuperación incompleta de las ramificaciones dendríticas pero con una reducción importante en el número y longitud de dendritas primarias y la longitud de las ramificaciones. Entonces, la pérdida neuronal de hierro conlleva a defectos en la función mitocondrial y en el metabolismo energético neuronal, lo que ocasiona defectos en la maduración dendrítica y sináptica en hipocampo de fetos y neonatos con DFe (247).

Durante el neurodesarrollo, el transporte de mitocondrias a las dendritas maduras cumple un papel primordial tanto en el crecimiento dendrítico como en la formación de espinas y sinapsis (248-253), este proceso demanda ATP (247). En neuronas de hipocampo, la DFe crónica causa un estado hipometabólico para el 11 DIV, incluyendo alteración del consumo de oxígeno mitocondrial y reducción del ATP. Al mismo tiempo, la quelación crónica de hierro altera la motilidad mitocondrial en las dendritas a través de los siguientes mecanismos: (1) aumento en el número de pausas que provoca una disminución de la velocidad de movimiento; (2) disminución del tamaño mitocondrial promedio con mayor porcentaje de mitocondrias pequeñas y redondas; y (3) movimiento anterógrado disminuido y retrogrado aumentado (254) (Fig. 10.).

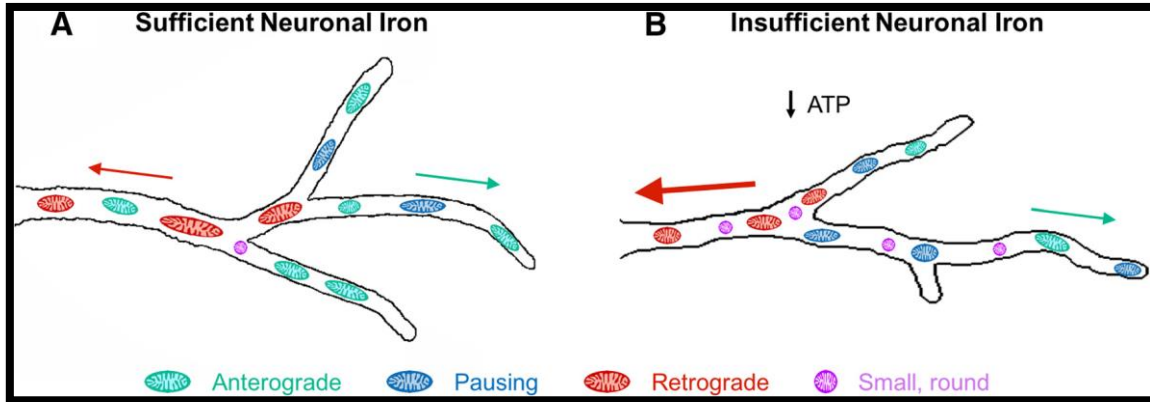


Fig. 10. Modificado de (254). Efectos de la restricción de hierro sobre la movilidad mitocondrial y el desarrollo de neuronas en el hipocampo. A) Movilidad mitocondrial en ramificaciones de dendritas terminales al 11 DIV en neuronas suficientes en hierro. B) Cambios en la movilidad mitocondrial en ramificaciones de dendritas terminales de neuronas DFe. El tamaño de las flechas indica la velocidad relativa en cada segmento del movimiento mitocondrial anterógrado (verde) y retrógrado (rojo). El tratamiento con DFO provoca DFe intracelular lo que a su vez altera la respiración mitocondrial y disminuye los niveles intracelulares de ATP al 11 DIV, lo que es consistente con energía neuronal insuficiente crónica. Las neuronas DFe exhiben al 11 DIV una disminución en la longitud mitocondrial y en un aumento en el porcentaje de mitocondrias pequeñas y redondas (magenta), aumento de las pausas mitocondriales (azul), disminución del movimiento anterógrado (verde) y un aumento de la velocidad segmental retrógrado (rojo). Al 18 DIV se observó disminución de la densidad mitocondrial dendrítica y en la complejidad de la arborización dendríticas. DIV, días *in vitro*.

Mediante análisis por software para medir la motilidad mitocondrial, se ha encontrado que el aumento en la frecuencia de las pausas, es el factor causal por el que disminuye la velocidad de las mitocondrias en dendritas con metabolismo de energía alterado debido a DFe (255). Ya que las proteínas motoras cinesina y la dineína requieren actividad ATPasa para transportar las mitocondrias (256), se ha hipotetizado que durante depleción crónica de energía el incremento de las pausas mitocondriales se debe a un decaimiento local intermitente del suministro de ATP secundario a la incapacidad de la respiración mitocondrial de mantener la constante demanda de ATP (257, 258), lo que es concordante con la detención local de mitocondrias cuando se aplican fármacos desacoplantes a nivel axonal (259).

La causa del incremento en el porcentaje de mitocondrias pequeñas (<0.5 μm) ante DFe crónica, quizá se deba a una alteración en la expresión de genes encargados de la fusión y fisión, posiblemente al activar vías reguladas corriente abajo inducidas por déficits de energía secundarios a DFO (254). Más aún, la

depleción de energía y desacoplamiento mitocondrial puede reducir el tamaño mitocondria al: inhibir la fusión mediada por Opa1 (proteína de opacidad 1) (260, 261) y al estimular la fisión mediada por Drp-1 (proteína relacionada con la dinamina) (262, 263).

El estado energético alterado puede incrementar la mitofagia (264), las neuronas que presentan mitocondrias defectuosas con membranas despolarizadas son las que muestran mayor mitofagia (265, 266). El hecho de que el transporte mitocondrial retrógrado esté aumentado en mitocondrias con potencial de membrana reducido (259, 265, 266), probablemente se deba a que la mitofagia ocurre principalmente en el soma neuronal (265, 267). Ya que el transporte retrógrado está aumentado en dendritas de neuronas con DFe quizá se deba al transporte de mitocondrias dañadas hacia el soma para su reciclaje (254). Incluso, la disfunción mitocondrial a edades tempranas se ha postulado como uno de los potenciales factores causales de desórdenes psiquiátricos ante la DFe (268, 269).

1.13.2 Deficiencia de hierro y corteza prefrontal

La corteza prefrontal también se ve afectada por la DFe durante etapas tempranas de diferenciación neuronal, y consecuentemente se observan alteraciones en pruebas cognitivas (270). Se ha estipulado que los desórdenes cognitivos y conductuales involucran la corteza prefrontal (PFC) y el hipocampo, áreas que se desarrollan rápidamente durante el período perinatal (271).

La formación del hipocampo es la principal estructura en la memoria de reconocimiento y sus variadas proyecciones con la PFC son esenciales para el procesamiento de la memoria espacial y la conversión de la memoria de corto plazo a largo plazo (272-274). Por lo tanto, ante DFe perinatal el hipocampo y las proyecciones prefrontales son las principales áreas afectadas del circuito de memoria explícito (178). La citocromo oxidasa c (CytOx) es un indicador de actividad neuronal (275), la DFe perinatal es capaz de modificar la distribución de la actividad intracelular de la CytOx en el cerebro de rata neonatal, siendo la formación del

hipocampo y sus proyecciones con la PFC las zonas con mayor pérdida de CytOx (178).

Las ratas con DFe postnatal presentan una conducta emocional alterada lo cual es un reflejo de los cambios ocurridos en la dopamina de la corteza prefrontal, pues en estas ratas las concentraciones extracelulares de este neurotransmisor son bajas (228). Mediante unión a un marcador radioactivo se ha reportado la existencia de densidades reducidas del D2R en corteza prefrontal (276), lo que sugiere una recaptura alterada de la dopamina en la corteza prefrontal secundaria a DFe (277). Las alteraciones dopaminérgicas en la corteza prefrontal probablemente contribuyen al comportamiento ansioso observado en ratas macho jóvenes con DFe severa (228).

El asa del área tegmental ventral representa la interconexión entre el hipocampo, la PFC y el tegmento ventral, este sistema es importante para la memoria a largo plazo y la flexibilidad cognitiva, y se encuentra regulada por neurotransmisores glutamatérgicos, gabaérgicos y dopaminérgicos. En el tegmentum ventral, las vías de entrada glutamatérgicas del hipocampo y PFC envían vías de salida hacia neuronas dopaminérgicas, logrando así modificar su actividad (278). La DFe en la vida temprana altera a largo plazo el metabolismo dopaminérgico en estas tres estructuras (222). Además, la neurotransmisión glutamatérgica también se ve alterada por la DFe perinatal lo que puede modificar indirectamente este sistema de memoria (179). Este conjunto de alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica y glutaminérgica quizá sea parte de la causa en las alteraciones a largo plazo sobre el rendimiento cognitivo y el comportamiento observadas ante DFe (222, 279, 280).

1.13.3 Deficiencia de hierro y cuerpo estriado

Durante la gestación tardía y el período posnatal temprano el cuerpo estriado sufre un rápido desarrollo, esta región cerebral es activada ante estímulos asociados a recompensa o ante la presencia estímulos nuevos, hostiles, nuevos, inesperados o intensos. Además, las alteraciones en los tractos nigro-estriados y en el

metabolismo de dopamina se relacionan con cambios en el control motor, percepción, memoria y motivación alteradas, lo que coincide con los cambios conductuales vistos en niños DFe (143, 224, 280-285).

Estudios en roedores expuestos precozmente a DFe apoyan la idea sobre los cambios conductuales asociados con alteraciones a corto y a largo plazo sobre la homeostasis estriatal de dopamina (222, 286). Estos cambios conductuales incluyen la aparición tardía en los reflejos de colocación de las extremidades evocados por estimulación de la barbilla o por vibrisas, series incompletas de aseo automático, excitación aumentada, y disminución de la conducta exploratoria. Las ratas recién nacidas DFe presentan déficits conductuales irreversibles a pesar de la restauración de la deficiencia, lo cual parece depender de una disminución del D2R (receptor 2 de dopamina) en el cuerpo estriado, esto apoya la existencia de alteraciones crónicas e irreversibles en cerebros tempranamente expuestos a DFe (280).

Los ratones DFe presentan actividad TH (tirosina hidroxilasa) de casi el doble (287), lo que apoya los hallazgos en el aumento de dopamina en cultivos celulares (288) y modelos en ratas con DFe temprana (289, 290). Además, el aumento de VMAT2 (transportador vesicular de monoaminas 2) también es consistente con el incremento de dopamina observado en ratones DFe. Incluso, el aumento del DAT (transportador de dopamina) también apoya el aumento extracelular de dopamina en el estriado (287).

Un gen reactivo a los cambios homeostáticos del hierro codifica la proteína Thy1 (291), que es una proteína de integral de membrana (292), y representa ~7.5% de las proteínas de membrana neuronal en el cerebro de los mamíferos (293, 294). En el cerebro, Thy-1 se distribuye principalmente en fracciones sinaptosómicas (295) donde cumple un papel en la regulación de la secreción de vesículas sinápticas (296). Ante DFe, Thy1 disminuye en cultivos celulares y modelos animales de DFe (288), lo que provoca pérdida de la integridad sináptica y probablemente alteraciones en los perfiles de neurotransmisores así como en los fenotipos

conductuales observados ante DFe. Incluso la disminución de Thy1 ante DFe es capaz de modificar por si sola el perfil dopaminérgico en el estriado (287).

La DFe gestacional y durante la lactancia, además de alterar el metabolismo de dopamina, también provoca aberraciones en el metabolismo de glutamato, en el metabolismo energético y en la producción de mielina. P. ej., los niveles de fosfocreatinina son mayores ante DFe y se acompaña de niveles más bajos de creatinina durante el período máximo de anemia, por lo que quizá la hipoxia sea responsable de estas alteraciones en el cuerpo estriado. Incluso la disminución de creatinina sugiere una defectuosa producción de energía en el cuerpo estriado secundaria a DFe (180).

Otra alteración observada en el metabolismo del cuerpo estriado secundaria a DFe temprana es el aumento del cociente glutamato:glutamina, indicando neurotransmisión glutaminérgica suprimida en esta área. La alteración en el metabolismo glutaminérgico quizá sea explicada por el compromiso energético presente ante DFe (180). Es probable que la neurotransmisión glutaminérgica suprimida sea la responsable del metabolismo alterado de dopamina en el cuerpo estriado (297). Asimismo, estos cambios glutaminérgicos también son observados en el hipocampo que a su vez interacciona con el sistema dopaminérgico estriatal (179). Por otra parte, el metabolito NAA (N-acetilaspártato) se encuentra aumentado en ratas con DFe temprana, esta alteración se relaciona con disminución del rendimiento conductual. Quizá las concentraciones estriatales altas de NAA representen un defecto de la desacetilación de NAA, la cual es necesaria para la formación de mielina, por lo que puede ser un indicio de alteraciones en la maduración mielínica (180).

1.14 Neuroglobina y deficiencia de hierro

A la fecha no existe información disponible.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los mamíferos expresan una hemoproteína en diversas áreas del sistema nervioso central llamada neuroglobina (Ngb), el ion hierro de esta proteína es esencial para que desempeñe sus diversas funciones. La Ngb actúa sobre vías oxidativas e hipoxia así como en vías de supervivencia y apoptosis, por lo que es considerada un factor neuroprotector cuando las células nerviosas se ven expuestas a situaciones estresantes. Además, cumple un papel primordial en el neurodesarrollo. Por otra parte, el hierro es un nutrimento esencial para el correcto funcionamiento del organismo, así como para el crecimiento y desarrollo. Sin embargo, la deficiencia de hierro (DFe) es un desorden nutricional extremadamente común que afecta más de dos mil millones de personas a nivel mundial, tanto en países industrializados como en vías de desarrollo. Además, la DFe es particularmente prevelante durante el embarazo y la infancia temprana, etapas donde predomina el crecimiento y desarrollo cerebral. La DFe ocasiona afecciones neurológicas algunas de ellas crónicas e irreversibles, principalmente durante la edad temprana. De acuerdo a la evidencia científica actual, las principales áreas cerebrales afectadas por la DFe son hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado, provocando alteraciones cognitivas, conductuales, motoras, auditivas, visuales y desórdenes psiquiátricos. La fisiopatología de estas alteraciones es compleja y se ha relacionado con deficiente incorporación de hierro a proteínas. No obstante, al momento no se ha estudiado la existencia de alguna variación en la presencia de Ngb en áreas cerebrales afectadas por DFe. Es por esta razón que se procederá a estudiar la relación entre DFe y Ngb, particularmente en cuanto a la presencia de Ngb en neuronas de hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado

En este sentido se genera la siguiente pregunta de investigación:

¿Se encuentra alterada la presencia de neuroglobina en neurona de hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado de sujetos expuestos a deficiencia de hierro?.

3. JUSTIFICACIÓN

La neuroglobina (Ngb) es una proteína ampliamente expresada en el sistema nervioso central de mamíferos, específicamente a nivel cerebral, donde es sobreexpresada bajo condiciones de estrés celular brindando neuroprotección al actuar sobre vías oxidativas e hipoxia, supervivencia celular y apoptosis. Durante la neurogénesis, Ngb tiene un papel importante en el crecimiento y desarrollo neuronal. Por otra parte, la DFe es una condición ubicua a nivel mundial y constituye la principal deficiencia de un micronutriente, siendo especialmente prevalente durante el embarazo y la infancia temprana. La DFe ocasiona alteraciones neurológicas como consecuencia de una deficiente incorporación de hierro a proteínas, ocasionando alteraciones en el neurometabolismo, deficiencia energética y estrés celular. Además, produce alteraciones estructurales, metabólicas y moleculares a nivel cerebral, principalmente en hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado. Estas alteraciones ocasionan una alta variedad de afecciones neurológicas, sobretodo cuando la DFe se presenta en etapas tempranas de la vida ya que durante este período causa alteraciones crónicas e irreversibles. Actualmente no existen estudios que indiquen si la presencia de Ngb se encuentra alterada en neuronas de áreas cerebrales afectadas por la DFe.

Al analizar la presencia de Ngb en neuronas de hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado ante DFe, se contará con información que indique si ante DFe las neuronas de estas áreas cerebrales cuentan con el factor neuroprotector y neurogénico brindado por Ngb.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis real: La presencia de neuroglobina se encuentra disminuida en neuronas de hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado de ratas expuestas a deficiencia de hierro.

Hipótesis alterna: La presencia de neuroglobina se encuentra aumentada en neuronas del hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado de ratas expuestas a deficiencia de hierro.

Hipótesis nula: La presencia de neuroglobina no se encuentra alterada en neuronas del hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado de ratas expuestas a deficiencia de hierro.

5. OBJETIVO

5.1 OBJETIVO GENERAL

Describir la presencia de neuroglobina en neuronas de hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado de ratas afectadas por deficiencia de hierro.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la localización de neuroglobina en neuronas de hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado de ratas con deficiencia de hierro.
2. Comparar el área colorimétrica de hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado entre ratas con deficiencia de hierro y controles.
3. Comparar la densidad colorimétrica de hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado entre ratas con deficiencia de hierro y controles.

6. MÉTODO

6.1 Operacionalización de variables

Independientes: Deficiencia de hierro

Dependientes: Presencia de neuroglobina

6.2 Diseño de estudio

Observacional cualitativo transversal.

6.3 Universo de trabajo y muestra (Método de muestreo)

6.3.1 Sujetos de estudio

Ratas macho cepa Wistar, las cuales se mantuvieron bajo condiciones estándar controladas en bioterio: ciclos de luz/oscuridad 12:12 (luces encendidas a las 5:00 am), con temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), comida y agua ad libitum. Todos los estudios cumplieron los principios y procedimientos descritos por los Institutos Nacionales de Salud; la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio y el comité local de la Universidad Autónoma del Estado de México.

6.3.2 Modelos animales

Modelo en ratas de deficiencia de hierro: Se emplearon como pie de cría 8 ratas hembras de la cepa Wistar con un peso de 300 gramos o 3 meses de edad. 14 días antes de la gestación, se alimentaron con dieta deficiente en hierro (10 ppm de sulfato ferroso) (298). Se utilizaron 2 machos de la misma cepa, colocando 1 macho con 2 hembras, respectivamente, durante un período de 7 días para asegurar la gestación. 21 días posteriores al parto, se destetó a las crías.

Grupo deficiente de hierro: conformado por 6 machos a lo que se les suministró el mismo alimento que consumió la madre hasta que cumplieron los 70 días postnatales.

Controles: Se utilizaron 4 ratas hembras de la cepa Wistar para pie de cría con un peso de 300 gramos o 3 meses de edad. Se utilizaron 2 machos de la misma cepa, colocando 1 cada macho con 2 hembras durante un período de 7 días, para asegurar la gestación. Posterior al parto las crías fueron mantenidas en condiciones estándar hasta la obtención de una muestra de 18 machos.

Grupo control: siguieron el mismo procedimiento que el grupo deficiente de hierro con la única diferencia en que el alimento consumido contuvo 100 ppm de sulfato ferroso. 6 machos fueron asignados al azar.

- Criterios de inclusión
 - Animales machos
- Criterios de exclusión
 - Animales hembra
- Criterios de eliminación
 - Animales que cursen con enfermedad dentro del período a evaluar
 - Animales que muestren comportamiento anormal dentro del período a evaluar

6.4 Técnica

6.4.1 Obtención de muestras de tejido cerebral para inmunofluorescencia

Todos los miembros de cada grupo (n=6), fueron destinados a la determinación de presencia de neuroglobina por inmunofluorescencia. Para la obtención de muestras de tejido cerebral de los animales fueron llevados a plano quirúrgico con 2 mL de pentobarbital sódico intraperitoneal (Pisabental, Pisa) y se procedió a la perfusión de tejidos. Para ello, primero se realizó apertura de la cavidad abdominal por incisión media (Fig. 11); posteriormente se pinzó la vena cava y la aorta abdominal con una pinza Kelly y se introdujo una cánula (Punzocat #14) por vía intracardiaca dirigida a la aorta ascendente. Seguidamente se realizó el corte de aurículas cardíacas y se procedió a la perfusión de 250 mL de buffer de fosfatos a través de la cánula, y a continuación 250 mL de paraformaldehído 4%, controlando la velocidad con una

bomba de perfusión (Gilson-Francia) a 14 mL/minuto. A continuación se procedió a la decapitación del animal y extracción del cerebro. Este último se colocó en 40 mL de solución de sacarosa al 10% por 24 horas, al término se sustituyó por sacarosa al 20% por 24 horas más y por último permaneció 24 horas más en sacarosa al 30%.



Fig. 11. Obtención de muestras de tejido cerebral.

6.4.2 Corte de tejido cerebral en parafina para inmunofluorescencia

Se realizó posfijación del tejido en formol amortiguado por 48 horas, para después sumergirlo en parafina. Posteriormente con microtomo automático se realizaron cortes de 2 μm a tres niveles: hipocampo (Fig. 12), corteza prefrontal (Fig. 13) y cuerpo estriado (Fig. 14). A continuación cada corte fue colocado en laminillas electrocargadas (Colorfrost Plus, Thermo Scientific).

6.4.3 Inmunofluorescencia

6.4.3.1 Anticuerpos primarios y marcaje

Anti-Ngb (Neuroglobina) Sigma N7162: Anticuerpo Ig-G rabbit, reconoce Ngb en humano, rata y ratón por inmunohistoquímica. A nivel cerebral este anticuerpo se une a Ngb presente en corteza cerebral, zonas subcorticales (hipocampo, tálamo e hipotálamo), núcleos de los nervios craneales del tronco encéfalico y corteza cerebelosa. A nivel subcelular la Ngb presenta localización citoplasmática constantemente en pericarion, procesos axonales, varicosidades axonales y sinapsis terminales (25, 30, 36, 37, 50, 55). Dentro del citoplasma de las neuronas, la Ngb es expresada en el citosol, mitocondrias y núcleos (31, 56-58). Además, Ngb se ha conservado extensamente durante su evolución y entre especies (8, 24).

Anti-NeuN (Neuronal Nuclei) PA5-37407: Anticuerpo Ig-G, reactivo a NeuN en humano, rata y ratón en inmunohistoquímica y Western Blot. Este anticuerpo tiñe exclusivamente a células neuronales en el sistema nervioso central y periférico, especialmente aquellas en estado de diferenciación, las postmitóticas, así como las totalmente diferenciadas. La tinción se localiza principalmente en el núcleo. Anti-NeuN tiñe la mayoría de las neuronas con sólo algunas excepciones, sin embargo, NeuN no tiene expresión en células gliales. Además, NeuN es detectada en una amplia variedad de especies, incluidos los mamíferos (299-301).

VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI: Fórmula para preservar fluorescencia, contiene 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). DAPI es una contratinción nuclear de uso común en técnicas de multifuorescencia, su fluorescencia azul destaca sobre la fluorescencia verde, amarilla o roja de otras estructuras, y tiñe específicamente los núcleos con casi ningún marcaje citoplasmático (302). Al unirse DAPI a dsNDA aumenta en aproximadamente 20 veces su fluorescencia (303).

6.4.3.2 Técnica de inmunofluorescencia

Se utilizó los cortes de las áreas descritas, cada lámina se enmarcó con plumón de cera alrededor de los cortes y se les colocó solución de bloqueo (PBS - Tritón 0.3% + Albúmina Sérica Bovina 5%) durante dos horas, posteriormente se agregó una solución 1:200 de anticuerpo primario anti-neuroglobina (Sigma –Aldrich N7162) y se incubó 24 horas a 4°C, en seguida se realizaron lavados y se colocó el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (Jackson 711-585-152) durante 60 minutos y se realizaron 3 lavados con PBS. A continuación se utilizó el anticuerpo primario anti-NeuN (Thermo Scientific PA5-37407) dilución 1:500 para la identificación de neuronas, nuevamente se incubaron 24 horas a 4°C, se efectuaron lavados y posteriormente se colocó anticuerpo secundario Alexa Fluor 647 (Jackson 115-545-146) por 60 minutos y se realizaron 3 lavados con PBS. Finalmente se colocó medio para montar con DAPI (Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI).

6.4.4 Obtención de imágenes

Una vez concluida la inmunofluorescencia, las láminillas se observaron con el microscopio de fluorescencia (Olympus, Japón). Tanto para el grupo control como en el modelos de deficiencia de hierro se observaron las siguientes áreas: hipocampo (Fig. 12), corteza prefrontal (Fig. 13) y cuerpo estriado (Fig. 14).

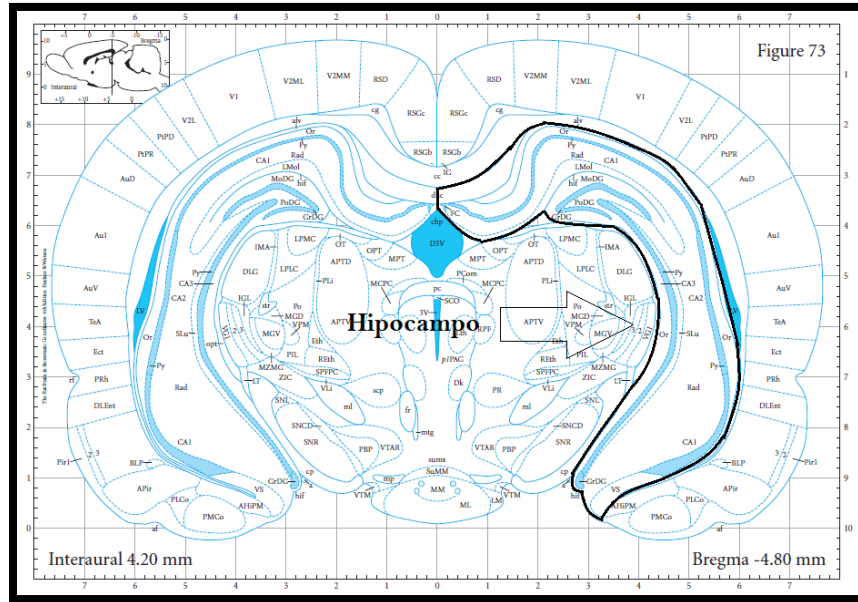


Fig. 12. Modificado de (304). Coordenadas estereotáxicas con figura representativa de un corte coronal de cerebro donde se indican con flechas el hipocampo.

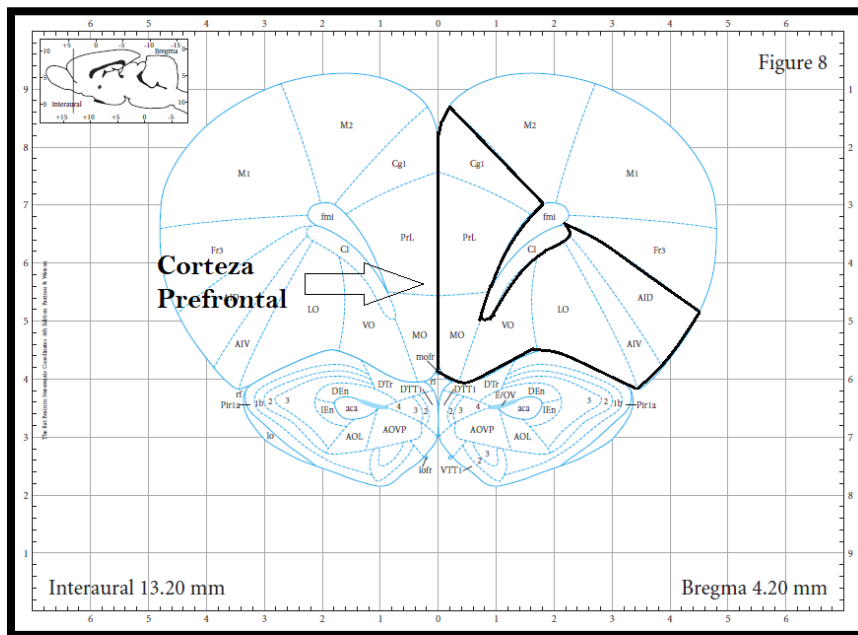


Fig. 13. Modificado de (304). Coordenadas estereotáxicas y figura representativa de corte coronal cerebral donde se señala la corteza prefrontal.

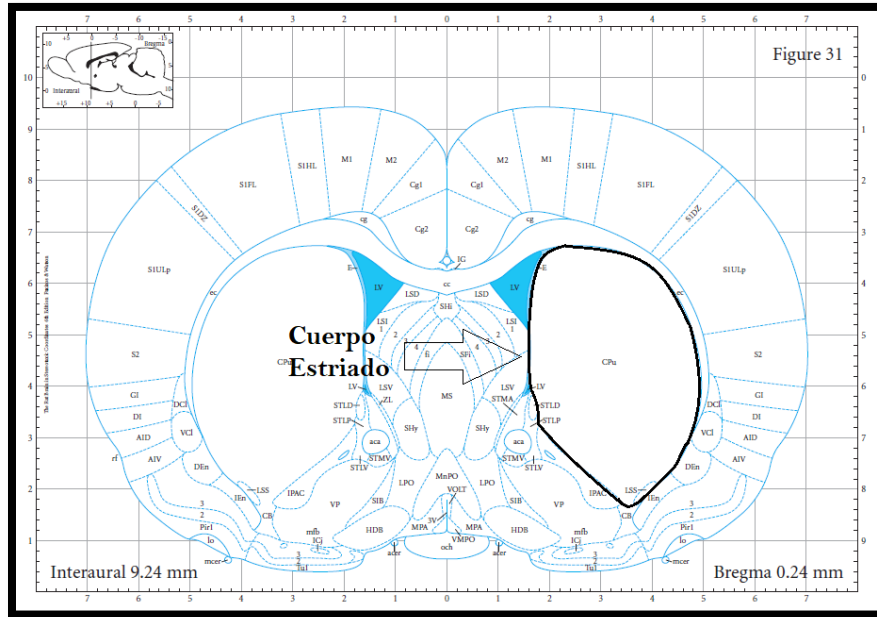


Fig. 14. Modificado de (304). Coordenadas estereotáxicas y figura representativa de un corte coronal de cerebro donde se indica con una flechas al cuerpo estriado.

Cada una de las laminillas de cada corte fueron enfocadas en las áreas de interés con objetivos 20X y 100X. Las imágenes se obtuvieron mediante la cámara de microscopio JENOPTIK GRYPHAX® ARKTUR y software JENOPTIK GRYPHAX® que permite realizar imágenes de fluorescencia únicas o múltiples. Se obtuvieron imágenes en un formato de almacenamiento JPG con las siguientes características:

- Dimensiones
 - 3840 pixeles de ancho
 - 2160 pixeles de alto
- Profundidad en bits
 - 24

A través de la herramienta “Multifluorescencia” se agregaron los filtros específicos para el microscopio Filterser 1, Filterset 4, Filterset 7, para la fluorescencia azul, verde y roja, respectivamente. Se ajustó la emisión de longitud de onda en nm para cada conjunto de filtros/fluorocromos. Finalmente, se almacenaron las imágenes tanto con los fluorocromos individualmente como combinados.

6.4.5 Procesamiento de imágenes

El análisis por computadora de las microfotografías se realizó mediante el software Image-Pro® Plus Version 7.0. El procesamiento digital de imágenes se llevó a cabo mediante la digitación de la imagen, lo cual consiste en la división de la imagen en una cuadrícula horizontal de regiones muy pequeñas llamadas elementos de imagen o píxeles. La imagen quedó representada en la computadora como una cuadrícula digital o mapa de bits, donde cada píxel es muestreado de forma individual, así como su brillo es medido y cuantificado. De lo anterior resulta en un valor de bits para cada píxel, este valor representa el nivel de brillantez u oscuridad en ese punto de la imagen. Al digitarse una imagen se fija una anchura y altura en el mapa de píxeles, lo que corresponde su resolución espacial.

Se usó el modelo de color RGB (Red, Green, Blue, por sus siglas en inglés) para el procesamiento de imágenes digitales, ya que es la forma más sencilla de representar imágenes a color y es el modelo más usado por la mayoría de los dispositivos de imagen digital (p. ej. monitores y cámaras de color). En el modelo RGB se hace uso de los tres colores primarios de luz, por lo que se puede representar cualquier color al hacerse una combinación de diferentes niveles de luz pura roja, verde o azul. En una imagen RGB 24 o “Color verdadero”, cada píxel posee un valor de 24 bits que a su vez se divide en tres muestras separadas de 8 bits (tripleto RGB o “chunk”), donde cada muestra representa el nivel de brillantez del respectivo canal de color (rojo, verde o azul). Estos valores de brillantez de cada canal de color (rojo, verde o azul) se representan en una escala de 0-255 niveles, el nivel 0 representa el color negro y el 255 la brillantez máxima de cada color.

Se usó la herramienta “Conteo y medición automática de objetos múltiples” del software Image-Pro® Plus Version 7.0, con la que se contaron y midieron automáticamente en las microfotografías el número objetos que contenían el color verde. Al haberse definido los objetos se delimitó el rango de las medidas que se usaron en este estudio:

- **Área con marcaje:** superficies que presentan píxeles dentro del rango seleccionado. Sólo se midieron los objetos con área dentro del rango de 150-10000 píxeles, con el objetivo de reducir posibles errores por el ruido de fondo.
- **Densidad, absorbancia o intensidad de la señal:** Reporta el valor promedio de la intensidad (cantidad de píxeles) de cada color (azul, verde o rojo). Se midieron objetos con intensidad de color verde (Ngb) dentro del rango de 20-255, con el objetivo de reducir posibles errores por el ruido de fondo.

Los resultados de las mediciones “área y densidad” se incorporaron a una ficha de datos, la cual se exportó a una hoja de cálculo en Microsoft Office Excel 2016.

6.6 Instrumento de investigación

- Observación al microscopio de fluorescencia (Olympus, Japón)
- Toma de microfotografías mediante software Jenoptik
- Análisis mediante software Image Pro Plus 7.0
- Software SPSS

6.7 Procedimiento

El proyecto se llevará a cabo en el laboratorio de Neurofisiología de la Conducta de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, de acuerdo con los principios y procedimientos descritos por los Institutos Nacionales de Salud.

6.8 Límite de tiempo y espacio

Junio 2018 a Febrero de 2020

6.9 Implicaciones éticas

Los animales experimentales permanecerán en cautiverio y con manejo adecuado de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio). Los experimentos que se llevarán a cabo se encuentran dentro de la categoría de aquellos que causan molestia o estrés mínimo: restricción momentánea del animal con propósitos de observación clínica; toma de muestras de sangre e inyección de sustancias por las vías intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal u oral. Estudios agudos sin supervivencia del animal encontrándose éste completamente anestesiado. Uso de métodos de eutanasia con inconsciencia rápida del sujeto; por ejemplo, sobredosis de anestésicos. Períodos cortos de abstinencia de agua o alimento equivalentes a lo que pudiera darse en forma natural.

6.7 Presupuesto y financiamiento

Financiamiento externo Internacional: Instituto de Nutrición y Salud Kellogg Company México S. de R.L. de C.V. Clave SIEA-UAEMex: 4843/2019E.

Financiamiento interno UAEMex: Proyectos de Investigación Científica para la Consolidación de los Grupos de Investigación y los Estudios Avanzados UAEM 2019. Clave SIEA-UAEMex: 4758/2019CIF.

6.8. Análisis estadístico

Se realizaron mediante el software IBM® SPSS® Statistics Version 25, como prueba de hipótesis se usó la prueba t para grupos independientes. Las variables de agrupación quedaron representadas como control y deficiente en hierro (DFe), y como variables de prueba el área y la densidad colorimétrica RGB. Los resultados con valores $p \leq 0.05$ se consideraron como estadísticamente significativos y se rechazó la hipótesis nula.

7. RESULTADOS

Después de realizar el proceso metodológico que consistió básicamente en marcar Ngb con anti-Ngb, identificar citoplasma y núcleos neuronales con NeuN y núcleos celulares con DAPI, para posteriormente colocalizarlos; se analizaron los resultados con objetivo 20X y 100X para comparar los datos de área y densidad colorimétrica de Ngb empleando el programa Image-Pro® Plus Version 7.0 en neuronas de hipocampo, cuerpo estriado y corteza prefrontal de ratas con deficiencia de hierro.

A continuación, se inicia la descripción de resultados en hipocampo, seguido de corteza prefrontal y cuerpo estriado.

7.1 Hipocampo

Los resultados de la evaluación hipocampal con objetivo 20X en sujetos DFe (Fig. 15) evidencia la presencia de Ngb en células neuronales. Además, se encontró disminución significativa ($p \leq 0.05$) del área con marcaje de Ngb (Gráfs. 1); sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas en densidad de marcaje.

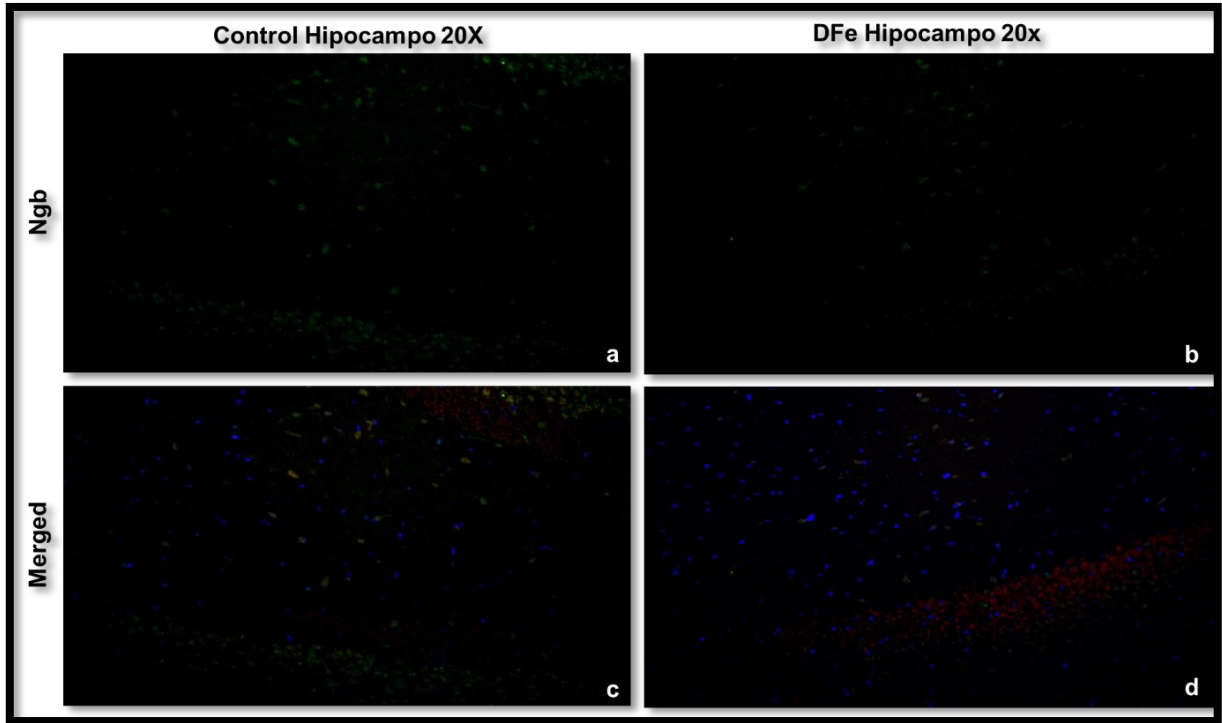
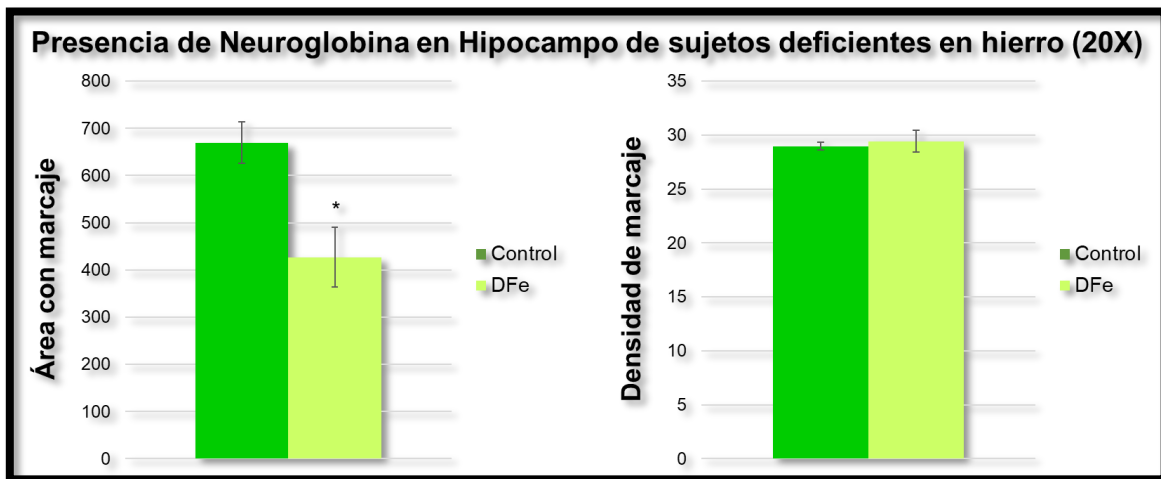


Fig. 15. Presencia de Ngb en hipocampo de sujetos deficientes en hierro (DFe). Microfotografías 20X de inmunofluorescencia para Ngb en hipocampo de rata control (a) y DFe (b). Ngb además se encuentra co-localizada con NeuN (rojo) y DAPI (azul) en rata control (c) y DFe (d).



Gráfs. 1. Colorimetría en hipocampo 20X de sujetos deficientes en hierro (DFe). La gráfica a la izquierda indica el área con marcaje contra Ngb y la gráfica a la derecha la densidad de marcaje contra Ngb en sujetos deficientes en hierro (DFe). Los datos están expresados como promedio \pm SE (error estándar de la media); * $p < 0.05$ en comparación con control. La barra verde oscura corresponde a sujetos control y la barra verde claro a sujetos DFe.

Con objetivo 100X en hipocampo se aprecian neuronas con localización somática de Ngb. Además, los sujetos DFe presentan un patrón de marcaje con mayor localización de Ngb fuera del soma neuronal, ya que gran parte de Ngb no colocaliza con NeuN ni DAPI (Fig. 16). Los sujetos DFe presentaron disminución significativa ($p \leq 0.05$) en la densidad de Ngb (Gráfs. 2).

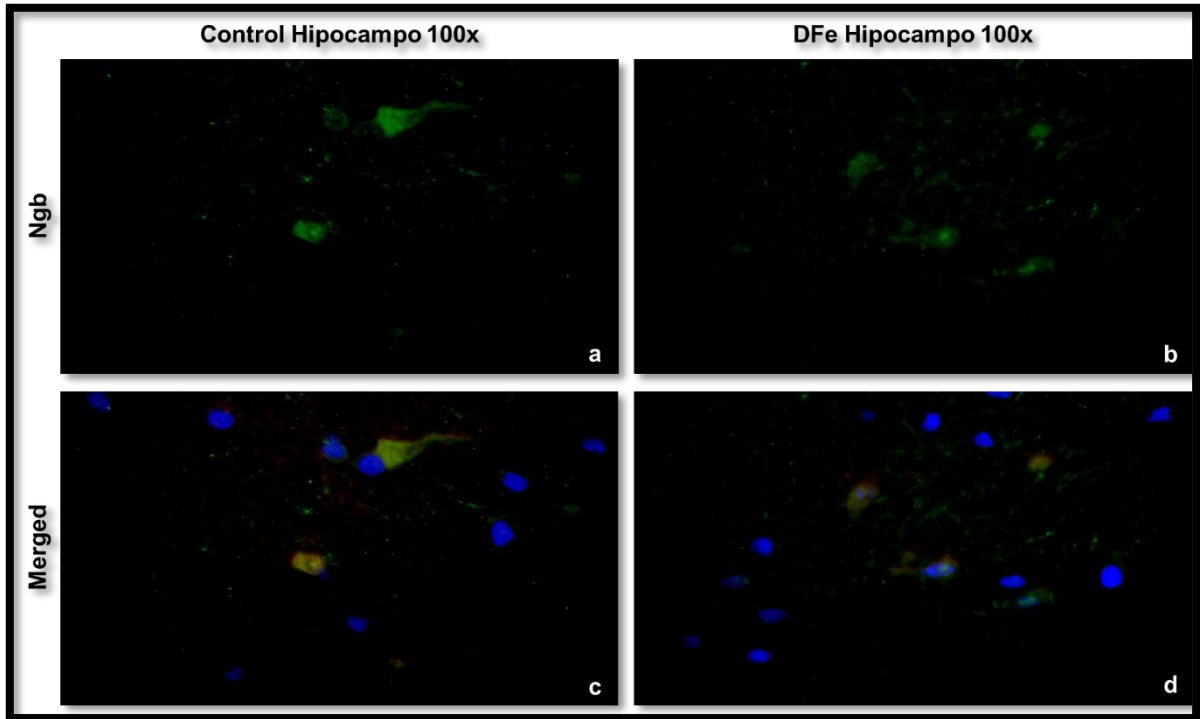
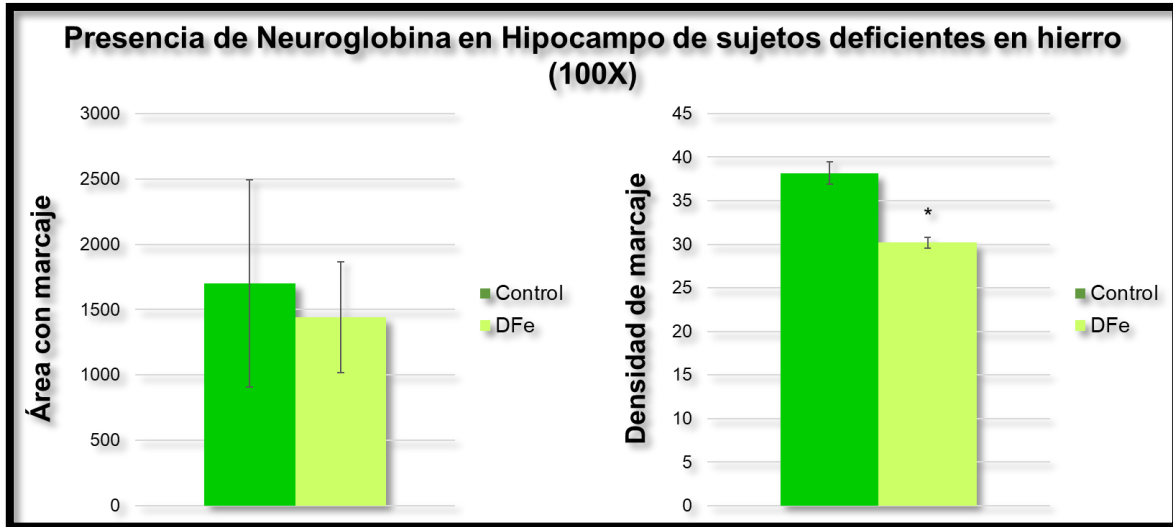


Fig. 16. Presencia de Ngb en hipocampo de sujetos deficientes en hierro (DFe). Microfotografías 100x de inmunofluorescencia para Ngb en hipocampo de rata control (a) y DFe (b). Ngb además se encuentra co-localizada con NeuN (rojo) y DAPI (azul) en rata control (c) y DFe (d).



Gráfs. 2. Colorimetría en hipocampo 100X de sujetos deficientes en hierro (DFe). La gráfica a la izquierda indica el área con marcaje contra Ngb y la gráfica a la derecha la densidad de marcaje contra Ngb en sujetos deficientes de hierro (DFe). Los datos están expresados como promedio \pm SE (error estándar de la media); * $p \leq 0.05$ en comparación con control. La barra verde oscura corresponde a sujetos control y la barra verde claro a sujetos DFe.

7.2 Corteza prefrontal

Los resultados de la evaluación en la corteza prefrontal con objetivo 20X en sujetos DFe (Fig. 17) evidencian localización neuronal de Ngb. Sin embargo, se encontró disminución significativa ($p \leq 0.05$) de Ngb (Gráfs. 3) tanto del área con marcaje como de la densidad de marcaje.

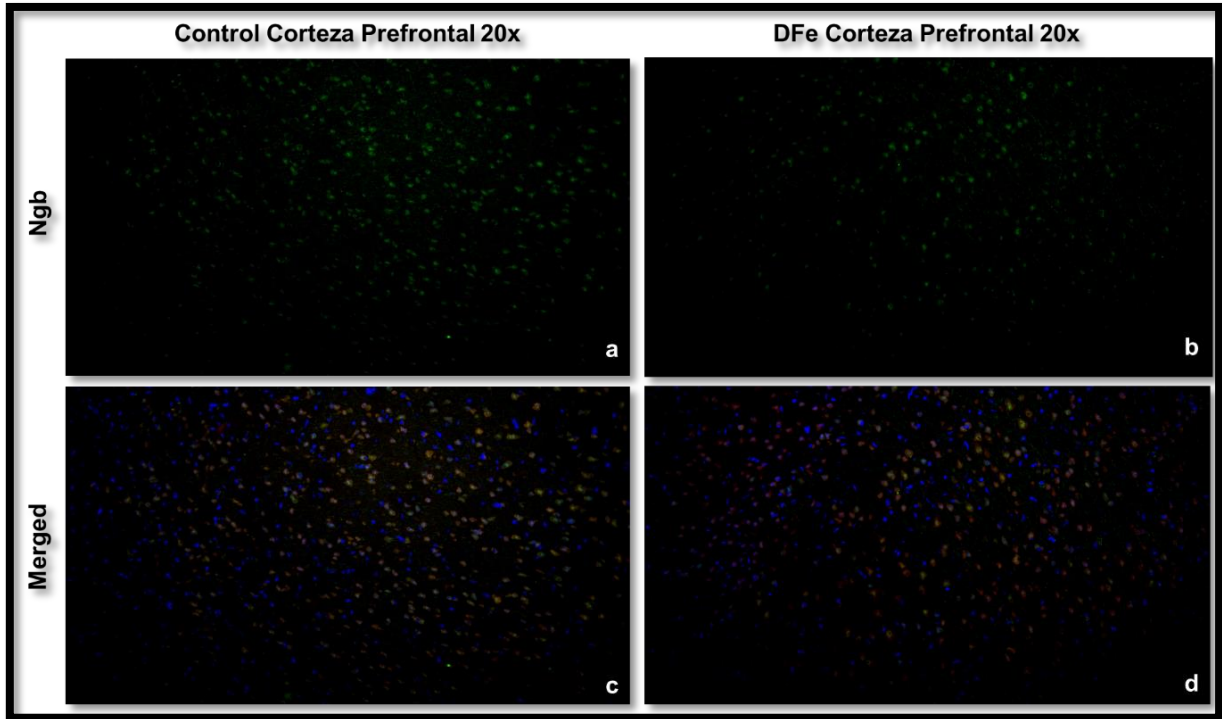
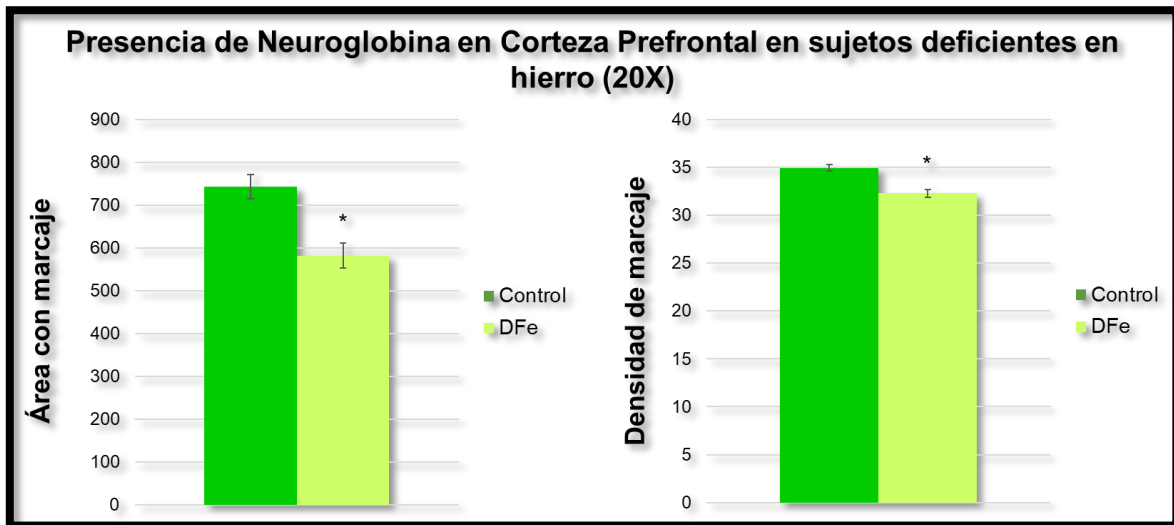


Fig. 17. Presencia de Ngb (color verde) en corteza prefrontal de sujetos deficientes en hierro (DFe). Microfotografías 20X de inmunofluorescencia para Ngb en corteza prefrontal de rata control (a) y DFe (b). Ngb además se encuentra co-localizada con NeuN (rojo) y DAPI (azul) en ratas control (c) y DFe (d).



Gráfs. 3. Colorimetría en corteza prefrontal 20X de sujetos deficientes en hierro (DFe). La gráfica a la izquierda indica el área con marcaje contra Ngb y la gráfica a la derecha la densidad de marcaje contra Ngb en sujetos deficientes de hierro (DFe). Los datos están expresados como promedio \pm SE (error estándar de la media); * $p \leq 0.05$ en comparación con control. La barra verde oscura corresponde a sujetos control y la barra verde claro a sujetos DFe.

Con objetivo 100X en corteza prefrontal se aprecian neuronas con localización somática de Ngb. Además, el patrón de marcaje en sujetos DFe muestra una mayor localización de Ngb fuera del soma neuronal, puesto que gran parte de Ngb no colocaliza con NeuN ni con DAPI (Fig. 18). No obstante, los sujetos DFe presentaron disminución significativa ($p \leq 0.05$) en el área con marcaje, mientras que presentaron aumento significativo ($p \leq 0.05$) en la densidad de marcaje (Gráfs. 4).

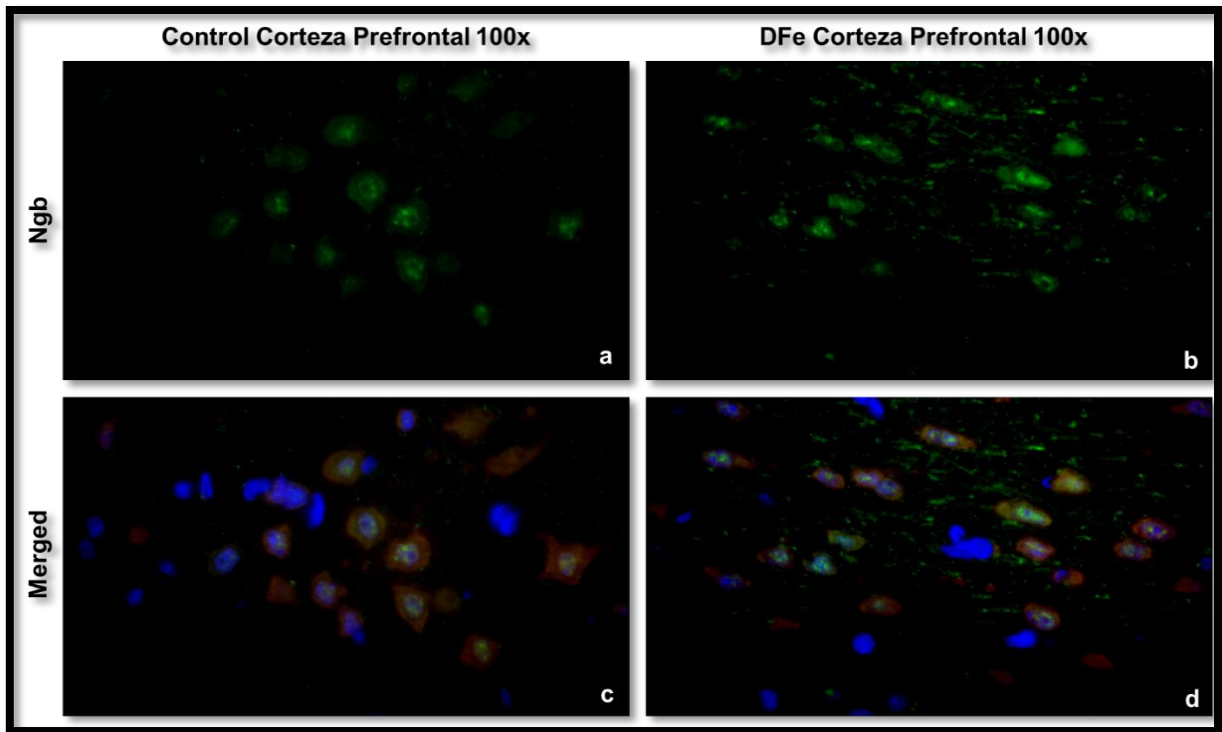
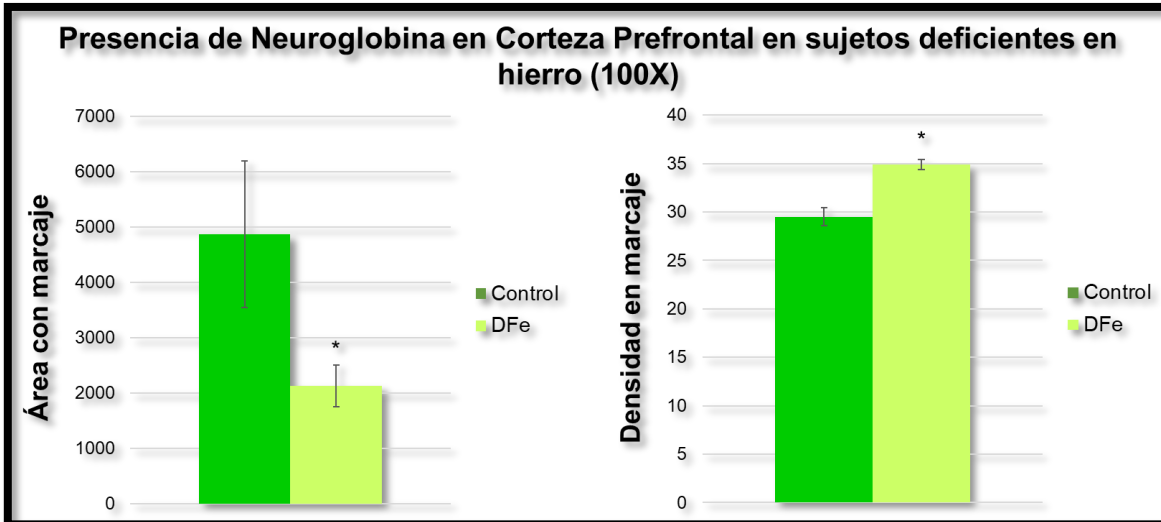


Fig. 18. Presencia de Ngb (color verde) en corteza prefrontal de sujetos deficientes en hierro (DFe). Microfotografías 100X de inmunofluorescencia para Ngb en corteza prefrontal de rata control (a) y DFe (b). Ngb además se encuentra co-localizada con NeuN (rojo) y DAPI (azul) en rata control (c) y DFe (d).



Gráfs. 4. Colorimetría en corteza prefrontal 100X de sujetos deficientes en hierro (DFe). La gráfica a la izquierda indica el área con marcaje contra Ngb y la gráfica a la derecha la densidad de marcaje contra Ngb en sujetos deficientes de hierro (DFe). Los datos están expresados como promedio \pm SE (error estándar de la media); * $p \leq 0.05$ en comparación con control. La barra verde oscura corresponde a sujetos control y la barra verde clara a sujetos DFe.

7.3 Cuerpo Estriado

Los resultados de la evaluación del cuerpo estriado con objetivo 20X en sujetos DFe (Fig. 19) evidencian localización neuronal de Ngb. Asimismo, se encontró incremento significativo ($p \leq 0.05$) de Ngb (Gráfs. 5) tanto del área con marcaje como de la densidad de marcaje.

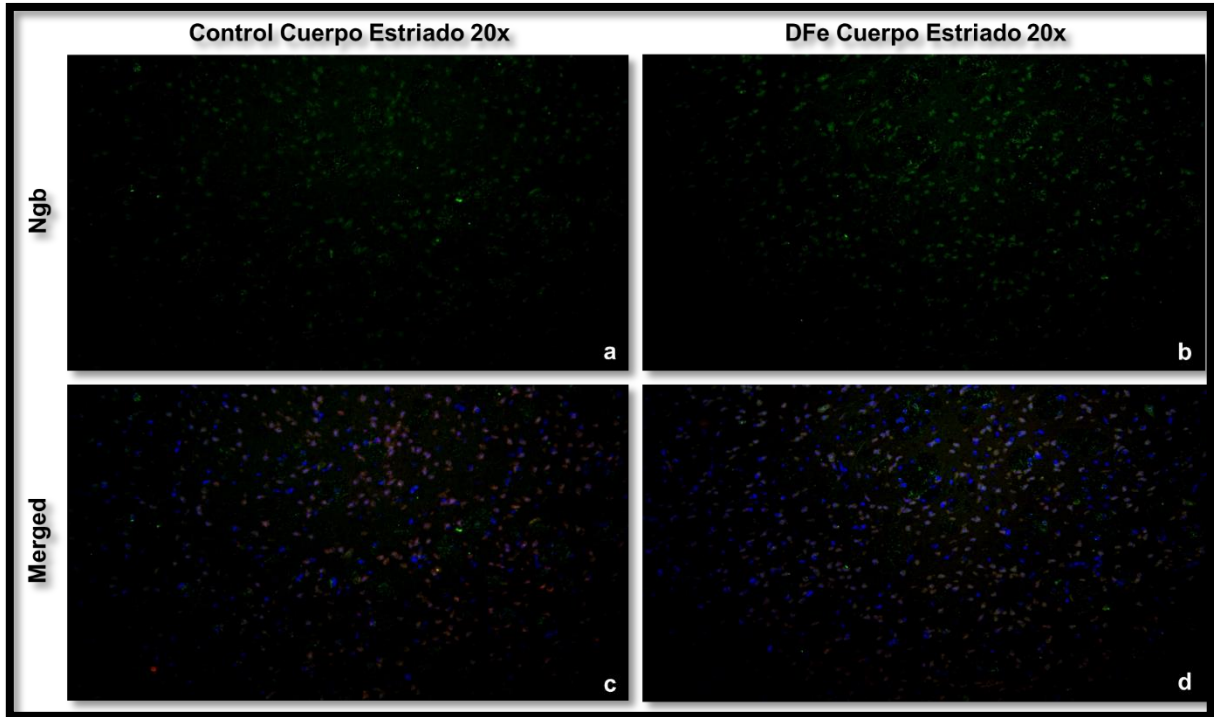
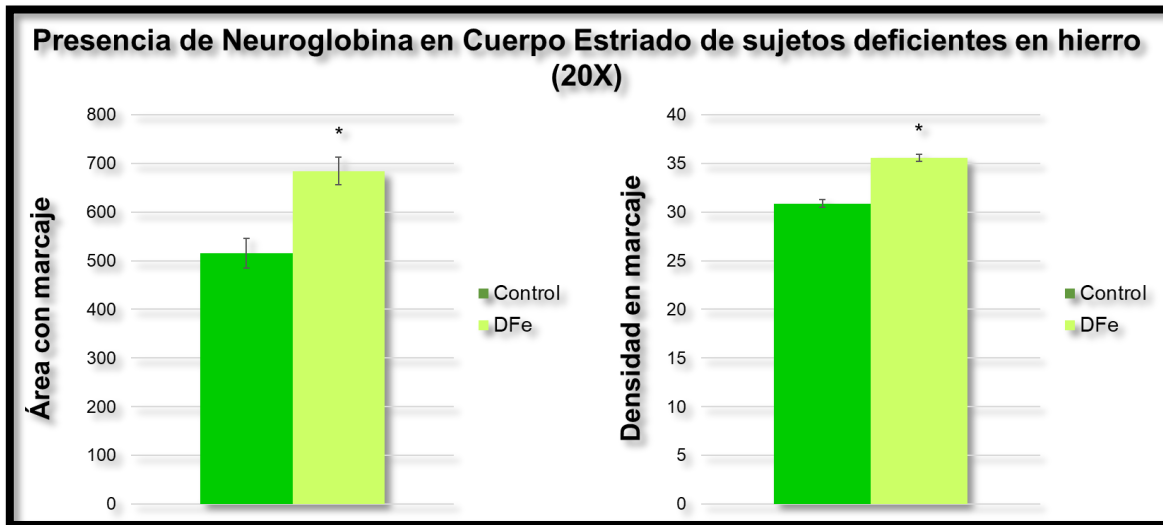


Fig. 19. Presencia de Ngb en cuerpo estriado de sujetos deficientes en hierro (DFe). Microfotografías 20x de inmunofluorescencia para Ngb en ganglios basales de rata control (a) y DFe (b). Ngb además se encuentra co-localizada con NeuN (rojo) y DAPI (azul) en rata control (c) y DFe (d).



Gráfs. 5. Colorimetría en cuerpo estriado 20X de sujetos deficientes en hierro (DFe). La gráfica a la izquierda indica el área con marcaje contra Ngb y la gráfica a la derecha la densidad de marcaje contra Ngb en sujetos deficientes de hierro (DFe). Los datos están expresados como promedio \pm SE (error estándar de la media); * $p < 0.05$ en comparación con control. La barra verde oscura corresponde a sujetos control y la barra verde claro a sujetos DFe.

Con objetivo 100X en cuerpo estriado se aprecia localización esencialmente somática de Ngb (Fig. 20). Los sujetos DFe presentaron incremento significativo ($p \leq 0.05$) en la densidad de marcaje, sin cambios significativos en el área con marcaje (Gráfs. 6).

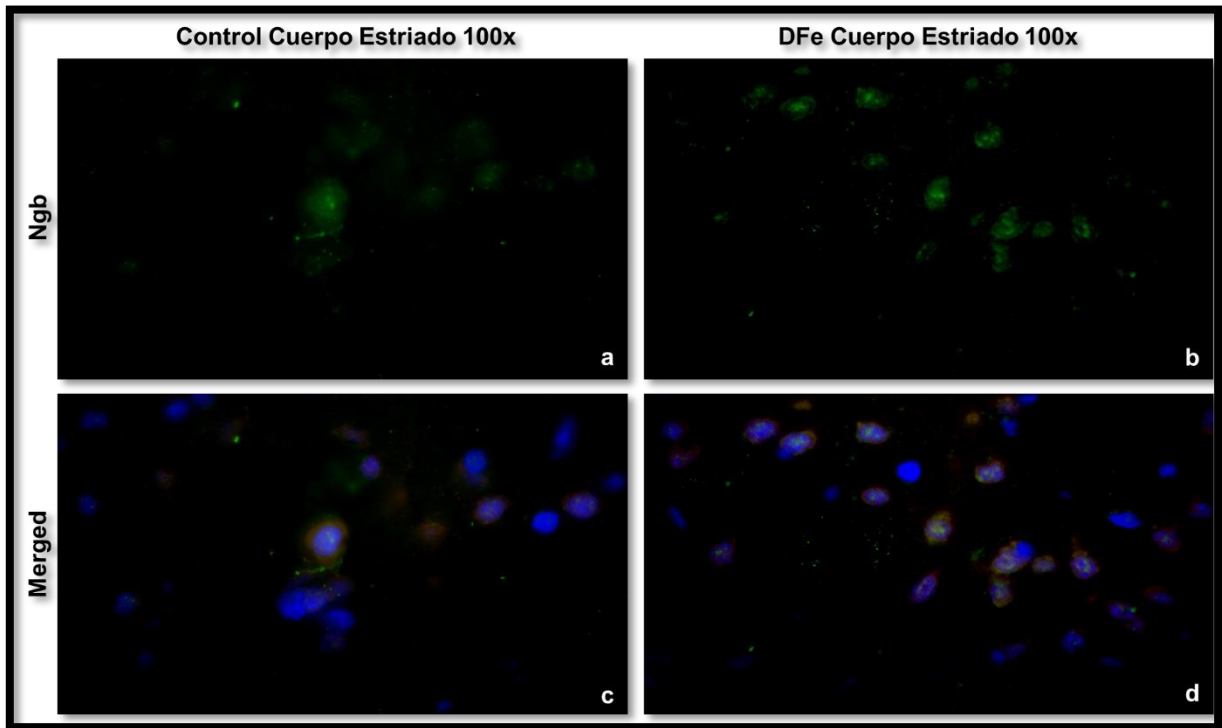
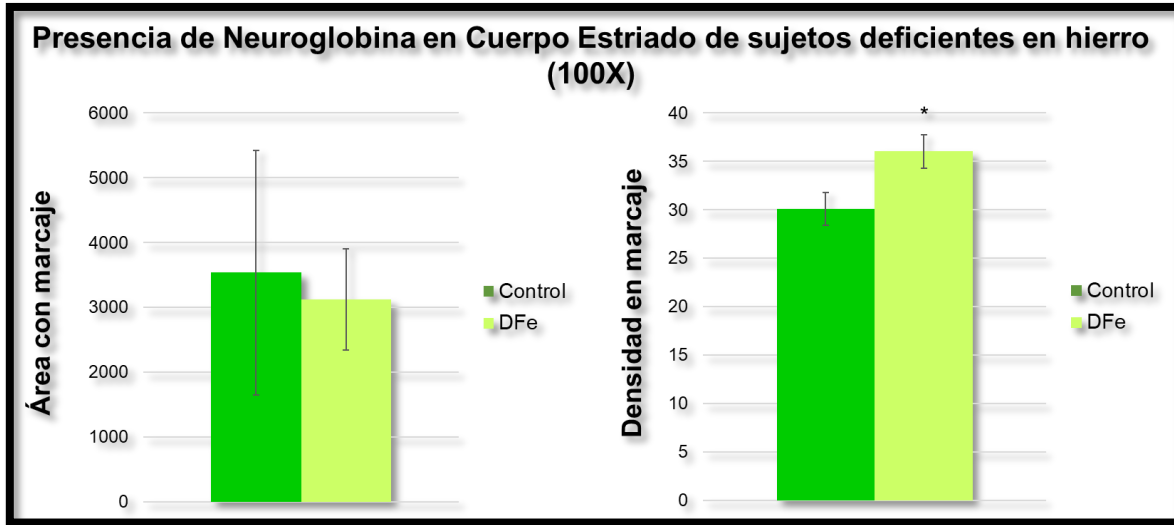


Fig. 20. Presencia de Ngb en cuerpo estriado de sujetos deficientes en hierro (DFe). Microfotografías 100x de inmunofluorescencia para Ngb en ganglios basales de rata control (a) y DFe (b). Ngb además se encuentra co-localizada con NeuN (rojo) y DAPI (azul) en rata control (c) y DFe (d).



Gráfs. 6. Colorimetría en cuerpo estriado 100x de sujetos deficientes en hierro (DFe). La gráfica a la izquierda indica el área con marcaje contra Ngb y la gráfica a la derecha la densidad de marcaje contra Ngb en sujetos deficientes de hierro (DFe). Los datos están expresados como promedio \pm SE (error estándar de la media); * $p \leq 0.05$ en comparación con control. La barra verde oscura corresponde a sujetos control y la barra verde claro a sujetos DFe.

8. DISCUSIÓN

La neuroglobina (Ngb) es una hemoproteína expresada en tejidos neuronales de diferentes especies animales, incluyendo a los mamíferos. El ion hierro de su grupo hemo es fundamental para que realice sus muchas de sus funciones (1, 12-14, 18). A nivel cerebral la Ngb se encuentra ampliamente expresada, donde se ha demostrado inmunomarcaje en corteza cerebral y zonas subcorticales, áreas que coinciden con alteraciones mayores por deficiencia de hierro.

La deficiencia de hierro (DFe) es un problema de salud pública de orden mundial, ya que es causante de múltiples afecciones con gran repercusión sobre la salud (131-133). Durante el neurodesarrollo, la DFe conlleva a alteraciones como: perturbaciones en la función motora, ansiedad, defectos cognitivos y conductuales, disfunción auditiva y visual, así como padecimientos psiquiátricos. La fisiopatología de estas alteraciones neurológicas, es compleja y comprende: mielinización disfuncional, dendritogénesis y sinaptogénesis anormal e inclusive daño en la síntesis de neurotransmisores y hormonas (159, 161).

En general, las alteraciones neurológicas de la DFe se han atribuido a una disminución en la incorporación del hierro hemoproteínas (176) y en consecuencia un metabolismo energético alterado (177), sin embargo, se desconocían sus efectos sobre la presencia de Ngb en áreas cerebrales afectadas por DFe como hipocampo, corteza prefrontal o cuerpo estriado, motivo del presente estudio.

Para llevar a cabo dicha investigación, se realizó un modelo experimental de deficiencia de hierro en rata Wistar, desde la gestación hasta que los productos llegaron a la edad adulta. Gracias a ello se logró identificar disminución de la presencia de Ngb en hipocampo y corteza prefrontal de sujetos adultos DFe. Sin embargo, en cuerpo estriado los resultados fueron contrarios, encontrándose incremento significativo de la presencia de Ngb. Esto resultados se obtuvieron a través del análisis de área con marcaje y densidad de marcaje calculada con el programa Image-Pro® Plus Version 7.0.

En este estudio al observar una región extensa del hipocampo y la corteza prefrontal con objetivo 20X se ha demostrado que los sujetos DFe presentaron una disminución neuronal significativa del área con marcaje de Ngb en ambas regiones, así como una disminución en la densidad de marcaje en corteza prefrontal (Gráfs. 1 y 3) (Fig. 15 y 17). El hipocampo es un área cortical relacionada con el aprendizaje y la memoria (240), por su parte, la corteza prefrontal es otro área cortical que se encuentra asociada con el comportamiento, personalidad, atención, planeación, control emocional, memoria y el habla (305-312).

Las neuronas del hipocampo y la corteza prefrontal son estructuras muy dinámicas, de alta actividad basal y complejidad estructural, en específico a nivel dendrítico, donde muestran patrones de descarga muy altos (313-322). Ante la DFe perinatal, estas áreas son unas de las que presentan mayor pérdida de actividad neuronal (178, 275). Incluso, mediante estudios in vivo de DFe se han demostrado anormalidades agudas y crónicas en el metabolismo energético de estas áreas (179, 180). Más aún, la DFe produce alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica y glutaminérgica del hipocampo y la corteza prefrontal, lo cual ha sido asociado con desórdenes cognitivos-conductuales y de la memoria (178, 228, 270-274, 276, 277).

Por lo tanto, podemos asumir que bajo estas circunstancias Ngb en hipocampo y corteza prefrontal no podría actuar como un factor neuroprotector puesto que sólo bajo condiciones de sobreexpresión puede activar mecanismos que eludan el déficit de energía y preserven la viabilidad de las células neuronales (74). Así mismo, tampoco sería capaz de suprimir la polarización somal (75), ni de modificar la vía apoptótica (77, 79, 80), ni promover el anabolismo (83).

Al evaluar con objetivo 100X y en consecuencia un mayor aumento de la región hipocámpal y corteza prefrontal, hemos demostrado en este estudio una disminución significativa en la densidad de marcaje de Ngb en neuronas de hipocampo, así como una disminución significativa en el área con marcaje y un aumento significativo en la densidad de marcaje de Ngb en neuronas de corteza prefrontal (Gráfs. 2 y 4) (Fig. 16 y 18). Además, tanto en neuronas de hipocampo

como de corteza prefrontal de sujetos DFe se observó mayor presencia de Ngb fuera del soma neuronal, puesto que gran parte de Ngb no colocalizó con NeuN ni con DAPI, siendo posible una mayor localización de Ngb en dendritas, axones o neuroglia (Fig. 16 y 18).

La célula piramidal es la principal neurona tanto en hipocampo como en corteza prefrontal, constituyendo 70-90% de las neuronas en estas regiones, por lo que es viable que sea la neurona más afectada por esta disminución de Ngb ante DFe. Esta neurona emana un axón a través de su soma y se ramifica profusamente emitiendo proyecciones con sinapsis glutaminérgicas excitatorias. Además, presenta abundantes arborizaciones y espinas dendríticas por medio de las cuales recibe un gran número de señales sinápticas (323-331).

La DFe temprana conduce a alteraciones en la expresión cerebral de proteínas relacionadas con la mielinización, morfología dendrítica, neuro-metabolismo y energía celular (183, 184). En hipocampo la DFe conlleva a alteraciones estructurales en sus neuronas, produciendo alteraciones en el neurodesarrollo y la plasticidad cerebral (241, 244-246). Inclusive la DFe en etapas tempranas condiciona que las neuronas piramidales del hipocampo desarrollen ramificaciones y espinas dendríticas aberrantes que persisten hasta la adultez (213, 242). Dichas alteraciones producen disfunción sináptica y se han sido asociado con alteraciones electrofisiológicas (215) y deficiencias en la memoria-aprendizaje (222, 243). Ya que la DFe condiciona un estado hipometabólico en estas neuronas (254), es posible que las alteraciones estructurales y en la maduración dendrítica y sináptica se deban a disfunción mitocondrial y a un inadecuado aporte energético neuronal durante el crecimiento dendrítico (183, 214, 247).

En nuestro estudio al verse disminuida la Ngb en hipocampo y corteza prefrontal de sujetos DFe es posible que bajo estas condiciones la Ngb no sea capaz de mejorar la supervivencia celular temprana, ni la neurogénesis y en consecuencia la plasticidad cerebral tanto en neuronas corticales como hipocámpales (61, 80, 91), puesto que es necesaria su sobreexpresión para que actúe regulando el desarrollo y crecimiento neuronal (91).

En este estudio al analizar un área extensa del cuerpo estriado con objetivo 20X hemos encontrado que los sujetos DFe presentaron un incremento neuronal significativo tanto en área de marcaje como en densidad de marcaje de Ngb en estriado (Gráfs. 5) (Fig. 19), lo que es contrario a lo observado en hipocampo y corteza prefrontal. El estriado es el principal sitio de entrada en los ganglios basales y se encarga de coleccionar y procesar la información proveniente de la corteza cerebral a través del sistema extrapiramidal. Además, el estriado se encuentra relacionado con funciones como aprendizaje, comportamiento, cognición, emociones, procesamiento y planeación del movimiento y toma de decisiones (145, 332-335).

La DFe durante etapas tempranas de la vida causa en el estriado alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica y glutaminérgica así como con aberraciones en la producción de mielina y en el metabolismo energético con producción defectuosa de energía (180). A consecuencia de la DFe se han observado alteraciones en la conducta, perturbaciones en el control motor, percepción, memoria y motivación, lo cual se ha relacionado con alteraciones en tractos nigro-estriados, trastornos en el metabolismo de dopamina (143, 222, 224, 280-286), alteraciones en la neurotransmisión y con pérdida de la integridad sináptica (287, 288, 296).

Es viable que los resultados opuestos en la presencia de Ngb entre el estriado y el hipocampo-corteza prefrontal se deban a diferencias en el tipo de neuronas presentes en estas regiones, puesto que en el estriado no se encuentran neuronas piramidales (336), por el contrario, la principal neurona del estriado es la neurona espinosa mediana (MSN, por sus siglas en inglés) que constituye 90% de las neuronas estriatales.

Las MSN del cuerpo estriado son neuronas gabaérgicas inhibitorias que a pesar de encontrarse altamente inervadas por sinapsis glutaminérgicas excitatorias (332-335, 337-339), son neuronas que tienen un bajo grado de actividad de fondo. Además, reflejan la actividad convergente de un gran número de aferentes corticales, por lo que en ausencia de una fuerte actividad sináptica o eventos

despolarizantes robustos se encuentran hiperpolarizadas, manteniendo una frecuencia de descarga baja (340-343). Adicionalmente, es posible que la DFe disminuya aún más el bajo grado de actividad de fondo en las MSN, al producir disfunción sináptica (222, 243) y reducción de la actividad neuronal (275) en neuronas corticales. Incluso, ante DFe temprana el estriado muestra compromiso energético, indicios de hipoxia y neurotransmisión glutaminérgica suprimida (180).

En nuestro estudio al analizar el estriado de sujetos DFe con objetivo 100X y por lo tanto con un mayor aumento, encontramos un aumento significativo en la densidad de marcaje de Ngb (Gráfs. 6) (Fig. 20). También se hizo evidente que la localización de Ngb fue esencialmente somática, ya Ngb colocalizó casi exclusivamente con NeuN y DAPI (Fig. 20). Sin embargo, de nuevo estos resultados difieren de los encontrados en neuronas de hipocampo y corteza prefrontal de sujetos DFe en donde, además, Ngb se encontró fuera del soma neuronal. Es posible que la localización exclusiva de Ngb en soma de neuronas estriatales, se deba a que en esta región las neuronas se encuentran formando grupos o islas y además las extensas arborizaciones de axones corticales y estriatales ocupan un gran volumen en el estriado (344-349).

Es muy probable que la sobreexpresión de Ngb en el soma de neuronas del estriado sea consecuencia del metabolismo energético alterado y la hipoxia ocasionada por la DFe. Por lo tanto, bajo estas circunstancias Ngb tiene la capacidad de actuar como un factor neuroprotector suprimiendo la polarización somal (75), inhibiendo la apoptosis (77, 79, 80), regulando del metabolismo energético, promoviendo el anabolismo (83), eludiendo el déficit de energía y finalmente preservando la viabilidad de estas células neuronales (74).

9. Conclusiones

Neuronas hipocampales y de corteza prefrontal presentan disminución en la presencia de neuroglobina ante DFe. En sujetos DFe es posible una mayor presencia de Ngb fuera del soma neuronal. Sin embargo, debido a que Ngb necesita ser sobreexpresada para cumplir sus funciones, estas áreas cerebrales carecen del factor neuroprotector y neurogénico brindado por Ngb.

Por el contrario, en el cuerpo estriado los sujetos DFe presentaron un incremento neuronal en la presencia de Ngb, es viable que estos resultados opuestos con el hipocampo y la corteza prefrontal se deban a diferencias en el tipo de neuronas presentes en estas regiones. Más aún, la localización de Ngb en estriado fue esencialmente somática. En consecuencia, es muy probable que el aumento de la presencia de Ngb actué como un factor neuroprotector en neuronas estriatales expuestas a DFe.

10. Perspectivas de estudio

Mejorar el procesamiento de microfotografías de inmunofluorescencia mediante el software JENOPTIK GRYPHAX al ajustar con precisión la longitud de onda en nm para la emisión pico del fluorocromo Alexa Fluor 488, que equivale a 519 nm.

12. Bibliografía

1. Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*. 2000;407(6803):520-3.
2. Guimaraes BG, Hamdane D, Lechauve C, Marden MC, Golinelli-Pimpaneau B. The crystal structure of wild-type human brain neuroglobin reveals flexibility of the disulfide bond that regulates oxygen affinity. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2014;70(Pt 4):1005-14.
3. Lechauve C, Jager M, Laguerre L, Kiger L, Correc G, Leroux C, et al. Neuroglobins, pivotal proteins associated with emerging neural systems and precursors of metazoan globin diversity. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(10):6957-67.
4. Vallone B, Nienhaus K, Brunori M, Nienhaus GU. The structure of murine neuroglobin: Novel pathways for ligand migration and binding. *Proteins*. 2004;56(1):85-92.
5. Bolognesi M, Bordo D, Rizzi M, Tarricone C, Ascenzi P. Nonvertebrate hemoglobins: structural bases for reactivity. *Progress in biophysics and molecular biology*. 1997;68(1):29-68.
6. Bashford D, Chothia C, Lesk AM. Determinants of a protein fold. Unique features of the globin amino acid sequences. *Journal of molecular biology*. 1987;196(1):199-216.
7. Guidolin D, Tortorella C, Marcoli M, Maura G, Agnati LF. Neuroglobin, a Factor Playing for Nerve Cell Survival. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(11).
8. Dewilde S, Kiger L, Burmester T, Hankeln T, Baudin-Creuzat V, Aerts T, et al. Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(42):38949-55.
9. Fago A, Mathews AJ, Dewilde S, Moens L, Brittain T. The reactions of neuroglobin with CO: evidence for two forms of the ferrous protein. *Journal of inorganic biochemistry*. 2006;100(8):1339-43.
10. Burmester T, Hankeln T. Neuroglobin: a respiratory protein of the nervous system. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*. 2004;19:110-3.
11. Hankeln T, Ebner B, Fuchs C, Gerlach F, Haberkamp M, Laufs TL, et al. Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *Journal of inorganic biochemistry*. 2005;99(1):110-9.
12. Trent JT, 3rd, Hvitved AN, Hargrove MS. A model for ligand binding to hexacoordinate hemoglobins. *Biochemistry*. 2001;40(20):6155-63.
13. Trent JT, 3rd, Watts RA, Hargrove MS. Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(32):30106-10.
14. Kiger L, Uzan J, Dewilde S, Burmester T, Hankeln T, Moens L, et al. Neuroglobin ligand binding kinetics. *IUBMB life*. 2004;56(11-12):709-19.
15. Watanabe S, Takahashi N, Uchida H, Wakasugi K. Human neuroglobin functions as an oxidative stress-responsive sensor for neuroprotection. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(36):30128-38.
16. Hamdane D, Kiger L, Dewilde S, Green BN, Pesce A, Uzan J, et al. The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(51):51713-21.
17. Fago A, Hundahl C, Dewilde S, Gilany K, Moens L, Weber RE. Allosteric regulation and temperature dependence of oxygen binding in human neuroglobin and cytoglobin. Molecular mechanisms and physiological significance. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(43):44417-26.

18. Brunori M, Giuffre A, Nienhaus K, Nienhaus GU, Scandurra FM, Vallone B. Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(24):8483-8.
19. Roesner A, Fuchs C, Hankeln T, Burmester T. A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals. *Molecular biology and evolution*. 2005;22(1):12-20.
20. Martin-Duran JM, Passamaneck YJ, Martindale MQ, Hejnal A. The developmental basis for the recurrent evolution of deuterostomy and protostomy. *Nature ecology & evolution*. 2016;1(1):5.
21. Go M. Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. *Nature*. 1981;291(5810):90-2.
22. Hardison RC. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(12):5675-9.
23. Wystub S, Ebner B, Fuchs C, Weich B, Burmester T, Hankeln T. Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements. *Cytogenetic and genome research*. 2004;105(1):65-78.
24. Fuchs C, Heib V, Kiger L, Haberkamp M, Roesner A, Schmidt M, et al. Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern, and ligand binding. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(23):24116-22.
25. Schmidt M, Giessl A, Laufs T, Hankeln T, Wolfrum U, Burmester T. How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(3):1932-5.
26. Ostojic J, Grozdanic S, Syed NA, Hargrove MS, Trent JT, 3rd, Kuehn MH, et al. Neuroglobin and cytoglobin distribution in the anterior eye segment: a comparative immunohistochemical study. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2008;56(9):863-72.
27. Schmidt M, Laufs T, Reuss S, Hankeln T, Burmester T. Divergent distribution of cytoglobin and neuroglobin in the murine eye. *Neuroscience letters*. 2005;374(3):207-11.
28. Roberts PA, Gaffney EA, Luthert PJ, Foss AJ, Byrne HM. Retinal oxygen distribution and the role of neuroglobin. *Journal of mathematical biology*. 2016;73(1):1-38.
29. Burmester T, Hankeln T. What is the function of neuroglobin? *The Journal of experimental biology*. 2009;212(Pt 10):1423-8.
30. Wystub S, Laufs T, Schmidt M, Burmester T, Maas U, Saaler-Reinhardt S, et al. Localization of neuroglobin protein in the mouse brain. *Neuroscience letters*. 2003;346(1-2):114-6.
31. Hundahl CA, Allen GC, Hannibal J, Kjaer K, Rehfeld JF, Dewilde S, et al. Anatomical characterization of cytoglobin and neuroglobin mRNA and protein expression in the mouse brain. *Brain research*. 2010;1331:58-73.
32. Lechauve C, Augustin S, Roussel D, Sahel JA, Corral-Debrinski M. Neuroglobin involvement in visual pathways through the optic nerve. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1834(9):1772-8.
33. De Marinis E, Marino M, Ascenzi P. Neuroglobin, estrogens, and neuroprotection. *IUBMB life*. 2011;63(3):140-5.
34. DellaValle B, Hempel C, Kurtzhals JA, Penkowa M. In vivo expression of neuroglobin in reactive astrocytes during neuropathology in murine models of traumatic brain injury, cerebral malaria, and autoimmune encephalitis. *Glia*. 2010;58(10):1220-7.
35. Di Giulio C, Zara S, De Colli M, Ruffini R, Porzionato A, Macchi V, et al. Cytoglobin and neuroglobin in the human brainstem and carotid body. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;788:59-64.

36. Hankeln T, Wystub S, Laufs T, Schmidt M, Gerlach F, Saaler-Reinhardt S, et al. The cellular and subcellular localization of neuroglobin and cytoglobin -- a clue to their function? *IUBMB life*. 2004;56(11-12):671-9.
37. Reuss S, Saaler-Reinhardt S, Weich B, Wystub S, Reuss MH, Burmester T, et al. Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience*. 2002;115(3):645-56.
38. Hundahl CA, Allen GC, Nyengaard JR, Dewilde S, Carter BD, Kelsen J, et al. Neuroglobin in the rat brain: localization. *Neuroendocrinology*. 2008;88(3):173-82.
39. Hundahl CA, Kelsen J, Dewilde S, Hay-Schmidt A. Neuroglobin in the rat brain (II): co-localisation with neurotransmitters. *Neuroendocrinology*. 2008;88(3):183-98.
40. Lopez IA, Acuna D, Shahram Y, Mowlds D, Ngan AM, Rungvivatjarus T, et al. Neuroglobin expression in the cochlea of rat pups exposed to chronic very mild carbon monoxide (25ppm) in air during and after the prenatal period. *Brain research*. 2010;1327:56-68.
41. Reuss S, Banica O, Elgurt M, Mitz S, Disque-Kaiser U, Riemann R, et al. Neuroglobin Expression in the Mammalian Auditory System. *Molecular neurobiology*. 2016;53(3):1461-77.
42. Vorasubin N, Hosokawa S, Hosokawa K, Ishiyama G, Ishiyama A, Lopez IA. Neuroglobin immunoreactivity in the human cochlea. *Brain research*. 2016;1630:56-63.
43. Chen XQ, Liu S, Qin LY, Wang CR, Fung YW, Yu AC. Selective regulation of 14-3-3beta in primary culture of cerebral cortical neurons and astrocytes during development. *Journal of neuroscience research*. 2005;79(1-2):114-8.
44. Chen XQ, Qin LY, Zhang CG, Yang LT, Gao Z, Liu S, et al. Presence of neuroglobin in cultured astrocytes. *Glia*. 2005;50(2):182-6.
45. Dong Y, Zhao R, Chen XQ, Yu AC. 14-3-3gamma and neuroglobin are new intrinsic protective factors for cerebral ischemia. *Molecular neurobiology*. 2010;41(2-3):218-31.
46. Emara M, Salloum N, Allalunis-Turner J. Expression and hypoxic up-regulation of neuroglobin in human glioblastoma cells. *Molecular oncology*. 2009;3(1):45-53.
47. Mitz SA, Reuss S, Folkow LP, Blix AS, Ramirez JM, Hankeln T, et al. When the brain goes diving: glial oxidative metabolism may confer hypoxia tolerance to the seal brain. *Neuroscience*. 2009;163(2):552-60.
48. Emara M, Turner AR, Allalunis-Turner J. Hypoxic regulation of cytoglobin and neuroglobin expression in human normal and tumor tissues. *Cancer cell international*. 2010;10:33.
49. Fordel E, Thijs L, Moens L, Dewilde S. Neuroglobin and cytoglobin expression in mice. Evidence for a correlation with reactive oxygen species scavenging. *The FEBS journal*. 2007;274(5):1312-7.
50. Geuens E, Brouns I, Flamez D, Dewilde S, Timmermans JP, Moens L. A globin in the nucleus! *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(33):30417-20.
51. Liu ZF, Zhang X, Qiao YX, Xu WQ, Ma CT, Gu HL, et al. Neuroglobin protects cardiomyocytes against apoptosis and cardiac hypertrophy induced by isoproterenol in rats. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(4):5351-60.
52. Moens L, Dewilde S. Globins in the brain. *Nature*. 2000;407(6803):461-2.
53. Oleksiewicz U, Liloglou T, Field JK, Xinarianos G. Cytoglobin: biochemical, functional and clinical perspective of the newest member of the globin family. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011;68(23):3869-83.
54. Ostojic J, Sakaguchi DS, de Lathouder Y, Hargrove MS, Trent JT, 3rd, Kwon YH, et al. Neuroglobin and cytoglobin: oxygen-binding proteins in retinal neurons. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006;47(3):1016-23.
55. Zhang C, Wang C, Deng M, Li L, Wang H, Fan M, et al. Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;290(5):1411-9.

56. De Marinis E, Fiocchetti M, Acconcia F, Ascenzi P, Marino M. Neuroglobin upregulation induced by 17beta-estradiol sequesters cytochrome c in the mitochondria preventing H2O2-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *Cell death & disease*. 2013;4:e508.
57. Fiocchetti M, Camilli G, Acconcia F, Leone S, Ascenzi P, Marino M. ERbeta-dependent neuroglobin up-regulation impairs 17beta-estradiol-induced apoptosis in DLD-1 colon cancer cells upon oxidative stress injury. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;149:128-37.
58. Fiocchetti M, Nuzzo MT, Totta P, Acconcia F, Ascenzi P, Marino M. Neuroglobin, a pro-survival player in estrogen receptor alpha-positive cancer cells. *Cell death & disease*. 2014;5:e1449.
59. Fiocchetti M, Cipolletti M, Leone S, Naldini A, Carraro F, Giordano D, et al. Neuroglobin in Breast Cancer Cells: Effect of Hypoxia and Oxidative Stress on Protein Level, Localization, and Anti-Apoptotic Function. *PLoS one*. 2016;11(5):e0154959.
60. Yu Z, Zhang Y, Liu N, Yuan J, Lin L, Zhuge Q, et al. Roles of Neuroglobin Binding to Mitochondrial Complex III Subunit Cytochrome c1 in Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Neurotoxicity in Primary Neurons. *Molecular neurobiology*. 2016;53(5):3249-57.
61. Hummler N, Schneider C, Giessel A, Bauer R, Walkinshaw G, Gassmann M, et al. Acute hypoxia modifies regulation of neuroglobin in the neonatal mouse brain. *Experimental neurology*. 2012;236(1):112-21.
62. Awenius C, Hankeln T, Burmester T. Neuroglobins from the zebrafish *Danio rerio* and the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;287(2):418-21.
63. Wang R, Halper-Stromberg E, Szymanski-Pierce M, Bassett SS, Avramopoulos D. Genetic determinants of neuroglobin transcription. *Neurogenetics*. 2014;15(1):65-75.
64. Laufs TL, Wystub S, Reuss S, Burmester T, Saaler-Reinhardt S, Hankeln T. Neuron-specific expression of neuroglobin in mammals. *Neuroscience letters*. 2004;362(2):83-6.
65. Schoenherr CJ, Anderson DJ. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science*. 1995;267(5202):1360-3.
66. Schoenherr CJ, Paquette AJ, Anderson DJ. Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(18):9881-6.
67. Zhang W, Tian Z, Sha S, Cheng LY, Philipsen S, Tan-Un KC. Functional and sequence analysis of human neuroglobin gene promoter region. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1809(4-6):236-44.
68. Shimojo M, Lee JH, Hersh LB. Role of zinc finger domains of the transcription factor neuron-restrictive silencer factor/repressor element-1 silencing transcription factor in DNA binding and nuclear localization. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(16):13121-6.
69. Liu N, Yu Z, Xiang S, Zhao S, Tjarnlund-Wolf A, Xing C, et al. Transcriptional regulation mechanisms of hypoxia-induced neuroglobin gene expression. *The Biochemical journal*. 2012;443(1):153-64.
70. Haines B, Demaria M, Mao X, Xie L, Campisi J, Jin K, et al. Hypoxia-inducible factor-1 and neuroglobin expression. *Neuroscience letters*. 2012;514(2):137-40.
71. Zhang CG, Li L, Deng MY, Xie F, Wang CL, Zhou WQ, et al. [Coding region cDNA sequence cloning of rat neuroglobin gene, its polymorphism feature and tissue expression profile analysis]. *Yi chuan xue bao = Acta genetica Sinica*. 2001;28(11):997-1001.
72. Guglielmotto M, Reineri S, Iannello A, Ferrero G, Vanzan L, Miano V, et al. E2 Regulates Epigenetic Signature on Neuroglobin Enhancer-Promoter in Neuronal Cells. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2016;10:147.

73. Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(38):36505-12.
74. Antao ST, Duong TT, Aran R, Witting PK. Neuroglobin overexpression in cultured human neuronal cells protects against hydrogen peroxide insult via activating phosphoinositide-3 kinase and opening the mitochondrial K(ATP) channel. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;13(6):769-81.
75. Khan AA, Mao XO, Banwait S, DerMardirossian CM, Bokoch GM, Jin K, et al. Regulation of hypoxic neuronal death signaling by neuroglobin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(6):1737-47.
76. Yu Z, Liu J, Guo S, Xing C, Fan X, Ning M, et al. Neuroglobin-overexpression alters hypoxic response gene expression in primary neuron culture following oxygen glucose deprivation. *Neuroscience*. 2009;162(2):396-403.
77. Fago A, Mathews AJ, Moens L, Dewilde S, Brittain T. The reaction of neuroglobin with potential redox protein partners cytochrome b5 and cytochrome c. *FEBS letters*. 2006;580(20):4884-8.
78. De Marinis E, Acaz-Fonseca E, Arevalo MA, Ascenzi P, Fiocchetti M, Marino M, et al. 17beta-Oestradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor beta-mediated neuroglobin up-regulation. *Journal of neuroendocrinology*. 2013;25(3):260-70.
79. Brittain T, Skommer J, Raychaudhuri S, Birch N. An antiapoptotic neuroprotective role for neuroglobin. *International journal of molecular sciences*. 2010;11(6):2306-21.
80. Raychaudhuri S, Skommer J, Henty K, Birch N, Brittain T. Neuroglobin protects nerve cells from apoptosis by inhibiting the intrinsic pathway of cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2010;15(4):401-11.
81. Suto D, Sato K, Ohba Y, Yoshimura T, Fujii J. Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via a haem redox state-independent mechanism. *The Biochemical journal*. 2005;392(Pt 2):399-406.
82. Yu Z, Liu N, Li Y, Xu J, Wang X. Neuroglobin overexpression inhibits oxygen-glucose deprivation-induced mitochondrial permeability transition pore opening in primary cultured mouse cortical neurons. *Neurobiology of disease*. 2013;56:95-103.
83. Cai B, Li W, Mao X, Winters A, Ryou MG, Liu R, et al. Neuroglobin Overexpression Inhibits AMPK Signaling and Promotes Cell Anabolism. *Molecular neurobiology*. 2016;53(2):1254-65.
84. Brazel CY, Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW. Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Progress in neurobiology*. 2003;69(1):49-69.
85. Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, et al. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*. 1999;23(2):247-56.
86. Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*. 1999;23(2):257-71.
87. Haines B, Mao X, Xie L, Spusta S, Zeng X, Jin K, et al. Neuroglobin expression in neurogenesis. *Neuroscience letters*. 2013;549:3-6.
88. Sun Y, Jin K, Mao XO, Xie L, Peel A, Childs JT, et al. Effect of aging on neuroglobin expression in rodent brain. *Neurobiology of aging*. 2005;26(2):275-8.
89. da Silva JS, Dotti CG. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neurogenesis. *Nature reviews Neuroscience*. 2002;3(9):694-704.
90. Lin Y, Jones BW, Liu A, Tucker JF, Rapp K, Luo L, et al. Retinoid receptors trigger neurogenesis in retinal degenerations. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(1):81-92.

91. Li L, Liu QR, Xiong XX, Liu JM, Lai XJ, Cheng C, et al. Neuroglobin promotes neurite outgrowth via differential binding to PTEN and Akt. *Molecular neurobiology*. 2014;49(1):149-62.
92. Yu Z, Cheng C, Liu Y, Liu N, Lo EH, Wang X. Neuroglobin promotes neurogenesis through Wnt signaling pathway. *Cell death & disease*. 2018;9(10):945.
93. Qi J, Jia Y, Wang W, Lu H, Wang Y, Li Z. The role of Bag2 in neurotoxicity induced by the anesthetic sevoflurane. *Journal of cellular biochemistry*. 2018.
94. Yang Z, Lv J, Li X, Meng Q, Yang Q, Ma W, et al. Sevoflurane decreases self-renewal capacity and causes c-Jun N-terminal kinase-mediated damage of rat fetal neural stem cells. *Scientific reports*. 2017;7:46304.
95. Zhu Y, Sun Y, Jin K, Greenberg DA. Hemin induces neuroglobin expression in neural cells. *Blood*. 2002;100(7):2494-8.
96. Zhang Y, Yang F, Gao Y, Shan Y, Dong Y, Liu H. Neuroglobin protects offspring rats from neuronal damage induced by sevoflurane exposure to pregnant rats by inhibiting endogenous apoptosis. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2019;76:17-24.
97. Ganz T, Nemeth E. Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2006;290(2):G199-203.
98. Andrews NC, Schmidt PJ. Iron homeostasis. *Annual review of physiology*. 2007;69:69-85.
99. Hower V, Mendes P, Torti FM, Laubenbacher R, Akman S, Shulaev V, et al. A general map of iron metabolism and tissue-specific subnetworks. *Molecular bioSystems*. 2009;5(5):422-43.
100. Monsen ER. Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability. *Journal of the American Dietetic Association*. 1988;88(7):786-90.
101. Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta haematologica*. 2009;122(2-3):78-86.
102. Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P. Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood*. 1999;93(12):4406-17.
103. Fleming MD, Trenor CC, 3rd, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, et al. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nature genetics*. 1997;16(4):383-6.
104. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 1997;388(6641):482-8.
105. Oakhill JS, Marritt SJ, Gareta EG, Cammack R, McKie AT. Functional characterization of human duodenal cytochrome b (Cybrd1): Redox properties in relation to iron and ascorbate metabolism. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1777(3):260-8.
106. Turi JL, Wang X, McKie AT, Nozik-Grayck E, Mamo LB, Crissman K, et al. Duodenal cytochrome b: a novel ferrireductase in airway epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006;291(2):L272-80.
107. Arosio P, Levi S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1800(8):783-92.
108. Theil EC. Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism. *The Journal of nutrition*. 2003;133(5 Suppl 1):1549S-53S.
109. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(26):19906-12.
110. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 2000;403(6771):776-81.

111. Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS letters*. 2000;480(2-3):147-50.
112. Schade AL, Caroline L. An Iron-binding Component in Human Blood Plasma. *Science*. 1946;104(2702):340-1.
113. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010;142(1):24-38.
114. Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*. 2006;108(4):1388-94.
115. Shaw GC, Cope JJ, Li L, Corson K, Hersey C, Ackermann GE, et al. Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature*. 2006;440(7080):96-100.
116. Ferreira GC, Gong J. 5-Aminolevulinate synthase and the first step of heme biosynthesis. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 1995;27(2):151-9.
117. Yoshida T, Biro P, Cohen T, Muller RM, Shibahara S. Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin. *European journal of biochemistry*. 1988;171(3):457-61.
118. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell metabolism*. 2005;1(3):191-200.
119. Johnson MB, Enns CA. Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood*. 2004;104(13):4287-93.
120. Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(30):20826-32.
121. Robb A, Wessling-Resnick M. Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood*. 2004;104(13):4294-9.
122. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(11):7806-10.
123. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(11):7811-9.
124. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306(5704):2090-3.
125. Hentze MW, Kuhn LC. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(16):8175-82.
126. Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annual review of nutrition*. 2008;28:197-213.
127. Allen LH. Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(5 Suppl):1280S-4S.
128. Siddappa AM, Rao R, Long JD, Widness JA, Georgieff MK. The assessment of newborn iron stores at birth: a review of the literature and standards for ferritin concentrations. *Neonatology*. 2007;92(2):73-82.
129. Collard KJ. Iron homeostasis in the neonate. *Pediatrics*. 2009;123(4):1208-16.
130. Tussing-Humphreys L, Pusatcioglu C, Nemeth E, Braunschweig C. Rethinking iron regulation and assessment in iron deficiency, anemia of chronic disease, and obesity: introducing hepcidin. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2012;112(3):391-400.

131. DeMaeyer E, Adiels-Tegman M. The prevalence of anaemia in the world. *World health statistics quarterly Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales*. 1985;38(3):302-16.
132. Stoltzfus R. Defining iron-deficiency anemia in public health terms: a time for reflection. *The Journal of nutrition*. 2001;131(2S-2):565S-7S.
133. Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Naghavi M, Wulf SK, Johns N, Lozano R, et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood*. 2014;123(5):615-24.
134. Lundqvist H, Sjoberg F. Food interaction of oral uptake of iron / a clinical trial using ⁵⁹Fe. *Arzneimittel-Forschung*. 2007;57(6A):401-16.
135. Pasricha SR, Drakesmith H, Black J, Hipgrave D, Biggs BA. Control of iron deficiency anemia in low- and middle-income countries. *Blood*. 2013;121(14):2607-17.
136. Stevens GA, Finucane MM, De-Regil LM, Paciorek CJ, Flaxman SR, Branca F, et al. Global, regional, and national trends in haemoglobin concentration and prevalence of total and severe anaemia in children and pregnant and non-pregnant women for 1995-2011: a systematic analysis of population-representative data. *The Lancet Global health*. 2013;1(1):e16-25.
137. Cameron BM, Neufeld LM. Estimating the prevalence of iron deficiency in the first two years of life: technical and measurement issues. *Nutrition reviews*. 2011;69 Suppl 1:S49-56.
138. Chang S, Wang L, Wang Y, Brouwer ID, Kok FJ, Lozoff B, et al. Iron-deficiency anemia in infancy and social emotional development in preschool-aged Chinese children. *Pediatrics*. 2011;127(4):e927-33.
139. Lukowski AF, Koss M, Burden MJ, Jonides J, Nelson CA, Kaciroti N, et al. Iron deficiency in infancy and neurocognitive functioning at 19 years: evidence of long-term deficits in executive function and recognition memory. *Nutritional neuroscience*. 2010;13(2):54-70.
140. Murray-Kolb LE, Beard JL. Iron treatment normalizes cognitive functioning in young women. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85(3):778-87.
141. Widdowson EM, Spray CM. Chemical development in utero. *Archives of disease in childhood*. 1951;26(127):205-14.
142. Di Renzo GC, Spano F, Giardina I, Brillo E, Clerici G, Roura LC. Iron deficiency anemia in pregnancy. *Women's health*. 2015;11(6):891-900.
143. Lozoff B, Wolf AW, Jimenez E. Iron-deficiency anemia and infant development: effects of extended oral iron therapy. *The Journal of pediatrics*. 1996;129(3):382-9.
144. Siimes MA, Vuori E, Kuitunen P. Breast milk iron--a declining concentration during the course of lactation. *Acta paediatrica Scandinavica*. 1979;68(1):29-31.
145. Mills RJ, Davies MW. Enteral iron supplementation in preterm and low birth weight infants. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012(3):CD005095.
146. Ferri C, Procianoy RS, Silveira RC. Prevalence and risk factors for iron-deficiency anemia in very-low-birth-weight preterm infants at 1 year of corrected age. *Journal of tropical pediatrics*. 2014;60(1):53-60.
147. Domellof M, Lonnerdal B, Abrams SA, Hernell O. Iron absorption in breast-fed infants: effects of age, iron status, iron supplements, and complementary foods. *The American journal of clinical nutrition*. 2002;76(1):198-204.
148. Kumar A, Rai AK, Basu S, Dash D, Singh JS. Cord blood and breast milk iron status in maternal anemia. *Pediatrics*. 2008;121(3):e673-7.
149. Maguire JL, Salehi L, Birken CS, Carsley S, Mamdani M, Thorpe KE, et al. Association between total duration of breastfeeding and iron deficiency. *Pediatrics*. 2013;131(5):e1530-7.
150. Iron deficiency in infants and young children: screening, prevention, clinical manifestations, and diagnosis. [Internet]. 2011.
151. Global Burden of Disease Pediatrics C, Kyu HH, Pinho C, Wagner JA, Brown JC, Bertozzi-Villa A, et al. Global and National Burden of Diseases and Injuries Among Children and Adolescents

Between 1990 and 2013: Findings From the Global Burden of Disease 2013 Study. *JAMA pediatrics*. 2016;170(3):267-87.

152. Subar AF, Krebs-Smith SM, Cook A, Kahle LL. Dietary sources of nutrients among US children, 1989-1991. *Pediatrics*. 1998;102(4 Pt 1):913-23.
153. Tuncalp, Pena-Rosas JP, Lawrie T, Bucagu M, Oladapo OT, Portela A, et al. WHO recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience-going beyond survival. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2017;124(6):860-2.
154. Butte NF, Fox MK, Briefel RR, Siega-Riz AM, Dwyer JT, Deming DM, et al. Nutrient intakes of US infants, toddlers, and preschoolers meet or exceed dietary reference intakes. *Journal of the American Dietetic Association*. 2010;110(12 Suppl):S27-37.
155. Eden AN. Iron deficiency and impaired cognition in toddlers: an underestimated and undertreated problem. *Paediatric drugs*. 2005;7(6):347-52.
156. Park K, Kersey M, Geppert J, Story M, Cutts D, Himes JH. Household food insecurity is a risk factor for iron-deficiency anaemia in a multi-ethnic, low-income sample of infants and toddlers. *Public health nutrition*. 2009;12(11):2120-8.
157. Taylor EM, Morgan EH. Developmental changes in transferrin and iron uptake by the brain in the rat. *Brain research Developmental brain research*. 1990;55(1):35-42.
158. Moos T. Brain iron homeostasis. *Danish medical bulletin*. 2002;49(4):279-301.
159. Algarin C, Peirano P, Garrido M, Pizarro F, Lozoff B. Iron deficiency anemia in infancy: long-lasting effects on auditory and visual system functioning. *Pediatric research*. 2003;53(2):217-23.
160. Algarin C, Nelson CA, Peirano P, Westerlund A, Reyes S, Lozoff B. Iron-deficiency anemia in infancy and poorer cognitive inhibitory control at age 10 years. *Developmental medicine and child neurology*. 2013;55(5):453-8.
161. Bakoyiannis I, Gkioka E, Daskalopoulou A, Korou LM, Perrea D, Pergialiotis V. An explanation of the pathophysiology of adverse neurodevelopmental outcomes in iron deficiency. *Reviews in the neurosciences*. 2015;26(4):479-88.
162. Low M, Farrell A, Biggs BA, Pasricha SR. Effects of daily iron supplementation in primary-school-aged children: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2013;185(17):E791-802.
163. Falkingham M, Abdelhamid A, Curtis P, Fairweather-Tait S, Dye L, Hooper L. The effects of oral iron supplementation on cognition in older children and adults: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition journal*. 2010;9:4.
164. Wachs TD, Georgieff M, Cusick S, McEwen BS. Issues in the timing of integrated early interventions: contributions from nutrition, neuroscience, and psychological research. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1308:89-106.
165. Cusick SE, Georgieff MK. The Role of Nutrition in Brain Development: The Golden Opportunity of the "First 1000 Days". *The Journal of pediatrics*. 2016;175:16-21.
166. Wachs TD, Pollitt E, Cueto S, Jacoby E, Creed-Kanashiro H. Relation of neonatal iron status to individual variability in neonatal temperament. *Developmental psychobiology*. 2005;46(2):141-53.
167. Geng F, Mai X, Zhan J, Xu L, Zhao Z, Georgieff M, et al. Impact of Fetal-Neonatal Iron Deficiency on Recognition Memory at 2 Months of Age. *The Journal of pediatrics*. 2015;167(6):1226-32.
168. Siddappa AM, Georgieff MK, Wewerka S, Worwa C, Nelson CA, Deregnier RA. Iron deficiency alters auditory recognition memory in newborn infants of diabetic mothers. *Pediatric research*. 2004;55(6):1034-41.

169. Tamura T, Goldenberg RL, Hou J, Johnston KE, Cliver SP, Ramey SL, et al. Cord serum ferritin concentrations and mental and psychomotor development of children at five years of age. *The Journal of pediatrics*. 2002;140(2):165-70.
170. Armony-Sivan R, Eidelman AI, Lanir A, Sredni D, Yehuda S. Iron status and neurobehavioral development of premature infants. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2004;24(12):757-62.
171. Amin SB, Orlando M, Eddins A, MacDonald M, Monczynski C, Wang H. In utero iron status and auditory neural maturation in premature infants as evaluated by auditory brainstem response. *The Journal of pediatrics*. 2010;156(3):377-81.
172. Lozoff B, Beard J, Connor J, Barbara F, Georgieff M, Schallert T. Long-lasting neural and behavioral effects of iron deficiency in infancy. *Nutrition reviews*. 2006;64(5 Pt 2):S34-43; discussion S72-91.
173. Pasricha SR, Hayes E, Kalumba K, Biggs BA. Effect of daily iron supplementation on health in children aged 4-23 months: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *The Lancet Global health*. 2013;1(2):e77-e86.
174. Steinmacher J, Pohlandt F, Bode H, Sander S, Kron M, Franz AR. Randomized trial of early versus late enteral iron supplementation in infants with a birth weight of less than 1301 grams: neurocognitive development at 5.3 years' corrected age. *Pediatrics*. 2007;120(3):538-46.
175. Wang B, Zhan S, Gong T, Lee L. Iron therapy for improving psychomotor development and cognitive function in children under the age of three with iron deficiency anaemia. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013(6):CD001444.
176. Wigglesworth JB, H. Iron dependent enzymes in the brain. *Brain Iron: Neurochemical and Behavioural Aspects*. 1988:25-66.
177. Dallman PR. Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency. *Annual review of nutrition*. 1986;6:13-40.
178. de Deungria M, Rao R, Wobken JD, Luciana M, Nelson CA, Georgieff MK. Perinatal iron deficiency decreases cytochrome c oxidase (CytOx) activity in selected regions of neonatal rat brain. *Pediatric research*. 2000;48(2):169-76.
179. Rao R, Tkac I, Townsend EL, Gruetter R, Georgieff MK. Perinatal iron deficiency alters the neurochemical profile of the developing rat hippocampus. *The Journal of nutrition*. 2003;133(10):3215-21.
180. Ward KL, Tkac I, Jing Y, Felt B, Beard J, Connor J, et al. Gestational and lactational iron deficiency alters the developing striatal metabolome and associated behaviors in young rats. *The Journal of nutrition*. 2007;137(4):1043-9.
181. Beard JL, Wiesinger JA, Connor JR. Pre- and postweaning iron deficiency alters myelination in Sprague-Dawley rats. *Developmental neuroscience*. 2003;25(5):308-15.
182. Connor JR, Menzies SL. Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia*. 1996;17(2):83-93.
183. Clardy SL, Wang X, Zhao W, Liu W, Chase GA, Beard JL, et al. Acute and chronic effects of developmental iron deficiency on mRNA expression patterns in the brain. *Journal of neural transmission Supplementum*. 2006(71):173-96.
184. Carlson ES, Stead JD, Neal CR, Petryk A, Georgieff MK. Perinatal iron deficiency results in altered developmental expression of genes mediating energy metabolism and neuronal morphogenesis in hippocampus. *Hippocampus*. 2007;17(8):679-91.
185. Lozoff B, Georgieff MK. Iron deficiency and brain development. *Seminars in pediatric neurology*. 2006;13(3):158-65.
186. Fretham SJ, Carlson ES, Georgieff MK. The role of iron in learning and memory. *Advances in nutrition*. 2011;2(2):112-21.

187. Shafir T, Angulo-Barroso R, Su J, Jacobson SW, Lozoff B. Iron deficiency anemia in infancy and reach and grasp development. *Infant behavior & development*. 2009;32(4):366-75.
188. Yokusoglu M, Nevruz O, Baysan O, Uzun M, Demirkol S, Avcu F, et al. The altered autonomic nervous system activity in iron deficiency anemia. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2007;212(4):397-402.
189. Berglund S, Domellof M. Meeting iron needs for infants and children. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2014;17(3):267-72.
190. Herguner S, Kelesoglu FM, Tanidir C, Copur M. Ferritin and iron levels in children with autistic disorder. *European journal of pediatrics*. 2012;171(1):143-6.
191. Latif A, Heinz P, Cook R. Iron deficiency in autism and Asperger syndrome. *Autism : the international journal of research and practice*. 2002;6(1):103-14.
192. Angulo-Barroso RM, Schapiro L, Liang W, Rodrigues O, Shafir T, Kaciroti N, et al. Motor development in 9-month-old infants in relation to cultural differences and iron status. *Developmental psychobiology*. 2011;53(2):196-210.
193. Tran TD, Tran T, Simpson JA, Tran HT, Nguyen TT, Hanieh S, et al. Infant motor development in rural Vietnam and intrauterine exposures to anaemia, iron deficiency and common mental disorders: a prospective community-based study. *BMC pregnancy and childbirth*. 2014;14:8.
194. Estrada JA, Contreras I, Pliego-Rivero FB, Otero GA. Molecular mechanisms of cognitive impairment in iron deficiency: alterations in brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor expression and function in the central nervous system. *Nutritional neuroscience*. 2014;17(5):193-206.
195. Qubty W, Renaud DL. Cognitive impairment associated with low ferritin responsive to iron supplementation. *Pediatric neurology*. 2014;51(6):831-3.
196. Chassagne P, Bahri O, Roca F. [Iron deficiency in elderly people: clinical presentation and management]. *Geriatric et psychologie neuropsychiatrie du vieillissement*. 2014;12 Suppl 2:11-5.
197. Peirano PD, Algarin CR, Chamorro R, Reyes S, Garrido MI, Duran S, et al. Sleep and neurofunctions throughout child development: lasting effects of early iron deficiency. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2009;48 Suppl 1:S8-15.
198. Peirano PD, Algarin CR, Chamorro RA, Reyes SC, Duran SA, Garrido MI, et al. Sleep alterations and iron deficiency anemia in infancy. *Sleep medicine*. 2010;11(7):637-42.
199. Beard JL, Connor JR. Iron status and neural functioning. *Annual review of nutrition*. 2003;23:41-58.
200. Yu GS, Steinkirchner TM, Rao GA, Larkin EC. Effect of prenatal iron deficiency on myelination in rat pups. *The American journal of pathology*. 1986;125(3):620-4.
201. Connor JR, Menzies SL. Altered cellular distribution of iron in the central nervous system of myelin deficient rats. *Neuroscience*. 1990;34(1):265-71.
202. Todorich B, Pasquini JM, Garcia CI, Paez PM, Connor JR. Oligodendrocytes and myelination: the role of iron. *Glia*. 2009;57(5):467-78.
203. Rosato-Siri MV, Badaracco ME, Ortiz EH, Belforte N, Clausi MG, Soto EF, et al. Oligodendrogenesis in iron-deficient rats: effect of apotransferrin. *Journal of neuroscience research*. 2010;88(8):1695-707.
204. Morath DJ, Mayer-Proschel M. Iron modulates the differentiation of a distinct population of glial precursor cells into oligodendrocytes. *Developmental biology*. 2001;237(1):232-43.
205. Kwik-Urbe CL, Gietzen D, German JB, Golub MS, Keen CL. Chronic marginal iron intakes during early development in mice result in persistent changes in dopamine metabolism and myelin composition. *The Journal of nutrition*. 2000;130(11):2821-30.

206. Connor JR, Phillips TM, Lakshman MR, Barron KD, Fine RE, Csiza CK. Regional variation in the levels of transferrin in the CNS of normal and myelin-deficient rats. *Journal of neurochemistry*. 1987;49(5):1523-9.
207. Han J, Day JR, Connor JR, Beard JL. Gene expression of transferrin and transferrin receptor in brains of control vs. iron-deficient rats. *Nutritional neuroscience*. 2003;6(1):1-10.
208. Monga M, Walia V, Gandhi A, Chandra J, Sharma S. Effect of iron deficiency anemia on visual evoked potential of growing children. *Brain & development*. 2010;32(3):213-6.
209. Wu LL, Zhang L, Shao J, Qin YF, Yang RW, Zhao ZY. Effect of perinatal iron deficiency on myelination and associated behaviors in rat pups. *Behavioural brain research*. 2008;188(2):263-70.
210. Lavenex P, Banta Lavenex P. Building hippocampal circuits to learn and remember: insights into the development of human memory. *Behavioural brain research*. 2013;254:8-21.
211. Pokorny J, Yamamoto T. Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. II. Development of ultrastructure in stratum lacunosum and moleculare. *Brain research bulletin*. 1981;7(2):121-30.
212. Pokorny J, Yamamoto T. Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. I. Development of dendritic arborisation in pyramidal neurons. *Brain research bulletin*. 1981;7(2):113-20.
213. Brunette KE, Tran PV, Wobken JD, Carlson ES, Georgieff MK. Gestational and neonatal iron deficiency alters apical dendrite structure of CA1 pyramidal neurons in adult rat hippocampus. *Developmental neuroscience*. 2010;32(3):238-48.
214. Jorgenson LA, Wobken JD, Georgieff MK. Perinatal iron deficiency alters apical dendritic growth in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Developmental neuroscience*. 2003;25(6):412-20.
215. Jorgenson LA, Sun M, O'Connor M, Georgieff MK. Fetal iron deficiency disrupts the maturation of synaptic function and efficacy in area CA1 of the developing rat hippocampus. *Hippocampus*. 2005;15(8):1094-102.
216. Rao R, Tkac I, Schmidt AT, Georgieff MK. Fetal and neonatal iron deficiency causes volume loss and alters the neurochemical profile of the adult rat hippocampus. *Nutritional neuroscience*. 2011;14(2):59-65.
217. Raman L, Tkac I, Ennis K, Georgieff MK, Gruetter R, Rao R. In vivo effect of chronic hypoxia on the neurochemical profile of the developing rat hippocampus. *Brain research Developmental brain research*. 2005;156(2):202-9.
218. Dallman PR, Schwartz HC. Myoglobin and cytochrome response during repair of iron deficiency in the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1965;44(10):1631-8.
219. Rothman DL, Behar KL, Hyder F, Shulman RG. In vivo NMR studies of the glutamate neurotransmitter flux and neuroenergetics: implications for brain function. *Annual review of physiology*. 2003;65:401-27.
220. Erikson KM, Jones BC, Beard JL. Iron deficiency alters dopamine transporter functioning in rat striatum. *The Journal of nutrition*. 2000;130(11):2831-7.
221. Erikson KM, Jones BC, Hess EJ, Zhang Q, Beard JL. Iron deficiency decreases dopamine D1 and D2 receptors in rat brain. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2001;69(3-4):409-18.
222. Felt BT, Beard JL, Schallert T, Shao J, Aldridge JW, Connor JR, et al. Persistent neurochemical and behavioral abnormalities in adulthood despite early iron supplementation for perinatal iron deficiency anemia in rats. *Behavioural brain research*. 2006;171(2):261-70.
223. Angulo-Kinzler RM, Peirano P, Lin E, Garrido M, Lozoff B. Spontaneous motor activity in human infants with iron-deficiency anemia. *Early human development*. 2002;66(2):67-79.
224. Lozoff B, Jimenez E, Hagen J, Mollen E, Wolf AW. Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. *Pediatrics*. 2000;105(4):E51.

225. Sesack SR, Carr DB, Omelchenko N, Pinto A. Anatomical substrates for glutamate-dopamine interactions: evidence for specificity of connections and extrasynaptic actions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;1003:36-52.
226. Biagioli M, Pinto M, Cesselli D, Zaninello M, Lazarevic D, Roncaglia P, et al. Unexpected expression of alpha- and beta-globin in mesencephalic dopaminergic neurons and glial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(36):15454-9.
227. Jellen LC, Lu L, Wang X, Unger EL, Earley CJ, Allen RP, et al. Iron deficiency alters expression of dopamine-related genes in the ventral midbrain in mice. *Neuroscience*. 2013;252:13-23.
228. Li Y, Kim J, Buckett PD, Bohlke M, Maher TJ, Wessling-Resnick M. Severe postnatal iron deficiency alters emotional behavior and dopamine levels in the prefrontal cortex of young male rats. *The Journal of nutrition*. 2011;141(12):2133-8.
229. Beard JL, Wiesinger JA, Jones BC. Cellular iron concentrations directly affect the expression levels of norepinephrine transporter in PC12 cells and rat brain tissue. *Brain research*. 2006;1092(1):47-58.
230. Burhans MS, Dailey C, Beard Z, Wiesinger J, Murray-Kolb L, Jones BC, et al. Iron deficiency: differential effects on monoamine transporters. *Nutritional neuroscience*. 2005;8(1):31-8.
231. McEchron MD, Goletiani CJ, Alexander DN. Perinatal nutritional iron deficiency impairs noradrenergic-mediated synaptic efficacy in the CA1 area of rat hippocampus. *The Journal of nutrition*. 2010;140(3):642-7.
232. Weinberg J, Dallman PR, Levine S. Iron deficiency during early development in the rat: behavioral and physiological consequences. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1980;12(4):493-502.
233. Felt BT, Peirano P, Algarin C, Chamorro R, Sir T, Kaciroti N, et al. Long-term neuroendocrine effects of iron-deficiency anemia in infancy. *Pediatric research*. 2012;71(6):707-12.
234. Barkey RJ, Amit T, Ben-Shachar D, Youdim MB. Characterization of the hepatic prolactin receptors induced by chronic iron deficiency and neuroleptics. *European journal of pharmacology*. 1986;122(2):259-67.
235. Barkey RJ, Ben-Shachar D, Amit T, Youdim MB. Increased hepatic and reduced prostatic prolactin (PRL) binding in iron deficiency and during neuroleptic treatment: correlation with changes in serum PRL and testosterone. *European journal of pharmacology*. 1985;109(2):193-200.
236. Lozoff B, Felt BT, Nelson EC, Wolf AW, Meltzer HW, Jimenez E. Serum prolactin levels and behavior in infants. *Biological psychiatry*. 1995;37(1):4-12.
237. Nelson CA, Bloom FE, Cameron JL, Amaral D, Dahl RE, Pine D. An integrative, multidisciplinary approach to the study of brain-behavior relations in the context of typical and atypical development. *Development and psychopathology*. 2002;14(3):499-520.
238. Siddappa AJ, Rao RB, Wobken JD, Leibold EA, Connor JR, Georgieff MK. Developmental changes in the expression of iron regulatory proteins and iron transport proteins in the perinatal rat brain. *Journal of neuroscience research*. 2002;68(6):761-75.
239. Schmidt AT, Waldow KJ, Grove WM, Salinas JA, Georgieff MK. Dissociating the long-term effects of fetal/neonatal iron deficiency on three types of learning in the rat. *Behavioral neuroscience*. 2007;121(3):475-82.
240. Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 2006;313(5790):1093-7.
241. Barks A, Fretham SJB, Georgieff MK, Tran PV. Early-Life Neuronal-Specific Iron Deficiency Alters the Adult Mouse Hippocampal Transcriptome. *The Journal of nutrition*. 2018;148(10):1521-8.

242. Greminger AR, Lee DL, Shrager P, Mayer-Proschel M. Gestational iron deficiency differentially alters the structure and function of white and gray matter brain regions of developing rats. *The Journal of nutrition*. 2014;144(7):1058-66.
243. Kennedy BC, Dimova JG, Siddappa AJ, Tran PV, Gewirtz JC, Georgieff MK. Prenatal choline supplementation ameliorates the long-term neurobehavioral effects of fetal-neonatal iron deficiency in rats. *The Journal of nutrition*. 2014;144(11):1858-65.
244. Carlson ES, Tkac I, Magid R, O'Connor MB, Andrews NC, Schallert T, et al. Iron is essential for neuron development and memory function in mouse hippocampus. *The Journal of nutrition*. 2009;139(4):672-9.
245. Fretham SJ, Carlson ES, Wobken J, Tran PV, Petryk A, Georgieff MK. Temporal manipulation of transferrin-receptor-1-dependent iron uptake identifies a sensitive period in mouse hippocampal neurodevelopment. *Hippocampus*. 2012;22(8):1691-702.
246. Pisansky MT, Wickham RJ, Su J, Fretham S, Yuan LL, Sun M, et al. Iron deficiency with or without anemia impairs prepulse inhibition of the startle reflex. *Hippocampus*. 2013;23(10):952-62.
247. Bastian TW, von Hohenberg WC, Mickelson DJ, Lanier LM, Georgieff MK. Iron Deficiency Impairs Developing Hippocampal Neuron Gene Expression, Energy Metabolism, and Dendrite Complexity. *Developmental neuroscience*. 2016;38(4):264-76.
248. Das Banerjee T, Dagda RY, Dagda M, Chu CT, Rice M, Vazquez-Mayorga E, et al. PINK1 regulates mitochondrial trafficking in dendrites of cortical neurons through mitochondrial PKA. *Journal of neurochemistry*. 2017;142(4):545-59.
249. Dickey AS, Strack S. PKA/AKAP1 and PP2A/Bbeta2 regulate neuronal morphogenesis via Drp1 phosphorylation and mitochondrial bioenergetics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(44):15716-26.
250. Fukumitsu K, Fujishima K, Yoshimura A, Wu YK, Heuser J, Kengaku M. Synergistic action of dendritic mitochondria and creatine kinase maintains ATP homeostasis and actin dynamics in growing neuronal dendrites. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2015;35(14):5707-23.
251. Fukumitsu K, Hatsukano T, Yoshimura A, Heuser J, Fujishima K, Kengaku M. Mitochondrial fission protein Drp1 regulates mitochondrial transport and dendritic arborization in cerebellar Purkinje cells. *Molecular and cellular neurosciences*. 2016;71:56-65.
252. Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*. 2004;119(6):873-87.
253. Lopez-Domenech G, Higgs NF, Vaccaro V, Ros H, Arancibia-Carcamo IL, MacAskill AF, et al. Loss of Dendritic Complexity Precedes Neurodegeneration in a Mouse Model with Disrupted Mitochondrial Distribution in Mature Dendrites. *Cell reports*. 2016;17(2):317-27.
254. Bastian TW, von Hohenberg WC, Georgieff MK, Lanier LM. Chronic Energy Depletion due to Iron Deficiency Impairs Dendritic Mitochondrial Motility during Hippocampal Neuron Development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2019;39(5):802-13.
255. Neumann S, Chassefeyre R, Campbell GE, Encalada SE. KymoAnalyzer: a software tool for the quantitative analysis of intracellular transport in neurons. *Traffic*. 2017;18(1):71-88.
256. Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*. 2010;68(4):610-38.
257. Mironov SL. Spontaneous and evoked neuronal activities regulate movements of single neuronal mitochondria. *Synapse*. 2006;59(7):403-11.
258. Mironov SL. ADP regulates movements of mitochondria in neurons. *Biophysical journal*. 2007;92(8):2944-52.

259. Miller KE, Sheetz MP. Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 13):2791-804.
260. Baricault L, Segui B, Guegand L, Olichon A, Valette A, Larminat F, et al. OPA1 cleavage depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals. *Experimental cell research*. 2007;313(17):3800-8.
261. Mishra P, Carelli V, Manfredi G, Chan DC. Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell metabolism*. 2014;19(4):630-41.
262. Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, et al. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(41):15803-8.
263. Toyama EQ, Herzig S, Courchet J, Lewis TL, Jr., Loson OC, Hellberg K, et al. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science*. 2016;351(6270):275-81.
264. Melser S, Lavie J, Benard G. Mitochondrial degradation and energy metabolism. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1853(10 Pt B):2812-21.
265. Cai Q, Zakaria HM, Simone A, Sheng ZH. Spatial parkin translocation and degradation of damaged mitochondria via mitophagy in live cortical neurons. *Current biology : CB*. 2012;22(6):545-52.
266. Ye X, Sun X, Starovoytov V, Cai Q. Parkin-mediated mitophagy in mutant hAPP neurons and Alzheimer's disease patient brains. *Human molecular genetics*. 2015;24(10):2938-51.
267. McWilliams TG, Prescott AR, Allen GF, Tamjar J, Munson MJ, Thomson C, et al. mito-QC illuminates mitophagy and mitochondrial architecture in vivo. *The Journal of cell biology*. 2016;214(3):333-45.
268. Manji H, Kato T, Di Prospero NA, Ness S, Beal MF, Krams M, et al. Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nature reviews Neuroscience*. 2012;13(5):293-307.
269. Streck EL, Goncalves CL, Furlanetto CB, Scaini G, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Mitochondria and the central nervous system: searching for a pathophysiological basis of psychiatric disorders. *Revista brasileira de psiquiatria*. 2014;36(2):156-67.
270. Schmidt AT, Alvarez GC, Grove WM, Rao R, Georgieff MK. Early iron deficiency enhances stimulus-response learning of adult rats in the context of competing spatial information. *Developmental cognitive neuroscience*. 2012;2(1):174-80.
271. Rice D, Barone S, Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental health perspectives*. 2000;108 Suppl 3:511-33.
272. ER K. Cellular mechanisms of learning and the biologic basis of individuality. *Principles of Neural Science*. 1991:1009–31.
273. Nelson CA. The ontogeny of human memory: A cognitive neuroscience perspective. *Developmental Psychology*. 1995;31(5): 723–38.
274. Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1986;6(10):2950-67.
275. Wong-Riley MT. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in neurosciences*. 1989;12(3):94-101.
276. Beard JL, Erikson KM, Jones BC. Neurobehavioral analysis of developmental iron deficiency in rats. *Behavioural brain research*. 2002;134(1-2):517-24.

277. Nelson C, Erikson K, Pinero DJ, Beard JL. In vivo dopamine metabolism is altered in iron-deficient anemic rats. *The Journal of nutrition*. 1997;127(12):2282-8.
278. Lisman JE, Grace AA. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*. 2005;46(5):703-13.
279. Lozoff B. Early iron deficiency has brain and behavior effects consistent with dopaminergic dysfunction. *The Journal of nutrition*. 2011;141(4):740S-6S.
280. Youdim MB, Yehuda S. The neurochemical basis of cognitive deficits induced by brain iron deficiency: involvement of dopamine-opiate system. *Cellular and molecular biology*. 2000;46(3):491-500.
281. Grantham-McGregor S, Ani C. A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *The Journal of nutrition*. 2001;131(2S-2):649S-66S; discussion 66S-68S.
282. Lozoff B, Jimenez E, Wolf AW. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. *The New England journal of medicine*. 1991;325(10):687-94.
283. Lozoff BB, G.; Viteri, FE.; Urrutia, JJ. Behavioral abnormalities in infants with iron deficiency anemia. *Iron deficiency: brain biochemistry and behavior*. 1982:p. 183-93.
284. Pollitt E, Hathirat P, Kotchabhakdi NJ, Missell L, Valyasevi A. Iron deficiency and educational achievement in Thailand. *The American journal of clinical nutrition*. 1989;50(3 Suppl):687-96; discussion 96-7.
285. Walter T, De Andraca I, Chadud P, Perales CG. Iron deficiency anemia: adverse effects on infant psychomotor development. *Pediatrics*. 1989;84(1):7-17.
286. Beard JL, Felt B, Schallert T, Burhans M, Connor JR, Georgieff MK. Moderate iron deficiency in infancy: biology and behavior in young rats. *Behavioural brain research*. 2006;170(2):224-32.
287. Connor JR, Wang XS, Neely EB, Ponnuru P, Morita H, Beard J. Comparative study of the influence of Thy1 deficiency and dietary iron deficiency on dopaminergic profiles in the mouse striatum. *Journal of neuroscience research*. 2008;86(14):3194-202.
288. Wang X, Wiesinger J, Beard J, Felt B, Menzies S, Earley C, et al. Thy1 expression in the brain is affected by iron and is decreased in Restless Legs Syndrome. *Journal of the neurological sciences*. 2004;220(1-2):59-66.
289. Beard JL, Unger EL, Bianco LE, Paul T, Rundle SE, Jones BC. Early postnatal iron repletion overcomes lasting effects of gestational iron deficiency in rats. *The Journal of nutrition*. 2007;137(5):1176-82.
290. Unger EL, Paul T, Murray-Kolb LE, Felt B, Jones BC, Beard JL. Early iron deficiency alters sensorimotor development and brain monoamines in rats. *The Journal of nutrition*. 2007;137(1):118-24.
291. Ye Z, Connor JR. Identification of iron responsive genes by screening cDNA libraries from suppression subtractive hybridization with antisense probes from three iron conditions. *Nucleic acids research*. 2000;28(8):1802-7.
292. Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(8):1045-54.
293. Morris R. Thy-1 in developing nervous tissue. *Developmental neuroscience*. 1985;7(3):133-60.
294. Morris RJ, Barber PC, Beech J, Raisman G. The distribution of Thy-1 antigen in the P.N.S. of the adult rat. *Journal of neurocytology*. 1983;12(6):1017-39.
295. Stohl W, Gonatas NK. Distribution of the thy-1 antigen in cellular and subcellular fractions of adult mouse brain. *Journal of immunology*. 1977;119(2):422-7.

296. Jeng CJ, McCarroll SA, Martin TF, Floor E, Adams J, Krantz D, et al. Thy-1 is a component common to multiple populations of synaptic vesicles. *The Journal of cell biology*. 1998;140(3):685-98.
297. Lovinger DM, Partridge JG, Tang KC. Plastic control of striatal glutamatergic transmission by ensemble actions of several neurotransmitters and targets for drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;1003:226-40.
298. Vieyra-Reyes P, Millan-Aldaco D, Palomero-Rivero M, Jimenez-Garces C, Hernandez-Gonzalez M, Caballero-Villarraso J. An iron-deficient diet during development induces oxidative stress in relation to age and gender in Wistar rats. *J Physiol Biochem*. 2017;73(1):99-110.
299. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1992;116(1):201-11.
300. Weyer A, Schilling K. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *Journal of neuroscience research*. 2003;73(3):400-9.
301. Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1996;44(10):1167-71.
302. Kubista M, Akerman B, Norden B. Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry*. 1987;26(14):4545-53.
303. Barcellona ML, Cardiel G, Gratton E. Time-resolved fluorescence of DAPI in solution and bound to polydeoxynucleotides. *Biochemical and biophysical research communications*. 1990;170(1):270-80.
304. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th ed. Amsterdam ; Boston ;: Academic Press/Elsevier; 2007.
305. Chudasama Y. Animal models of prefrontal-executive function. *Behavioral neuroscience*. 2011;125(3):327-43.
306. Dehn MJ. How working memory enables fluid reasoning. *Applied neuropsychology Child*. 2017;6(3):245-7.
307. Fuster JM. *The prefrontal cortex*. Fifth edition. ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier; 2015. xv, 444 pages p.
308. Kolb B, Mychasiuk R, Muhammad A, Li Y, Frost DO, Gibb R. Experience and the developing prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109 Suppl 2:17186-93.
309. Liu ZX, Grady C, Moscovitch M. Effects of Prior-Knowledge on Brain Activation and Connectivity During Associative Memory Encoding. *Cerebral cortex*. 2017;27(3):1991-2009.
310. Murray JD, Bernacchia A, Roy NA, Constantinidis C, Romo R, Wang XJ. Stable population coding for working memory coexists with heterogeneous neural dynamics in prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(2):394-9.
311. Oren N, Shapira-Lichter I, Lerner Y, Hendler T, Giladi N, Ash EL. How attention modulates encoding of dynamic stimuli in older adults. *Behavioural brain research*. 2018;347:209-18.
312. Ustun S, Kale EH, Cicek M. Neural Networks for Time Perception and Working Memory. *Frontiers in human neuroscience*. 2017;11:83.
313. Ruan YW, Zou B, Fan Y, Li Y, Lin N, Zeng YS, et al. Dendritic plasticity of CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia. *Neuroscience*. 2006;140(1):191-201.
314. Connors BW, Gutnick MJ. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends in neurosciences*. 1990;13(3):99-104.
315. Fuster JM. Unit activity in prefrontal cortex during delayed-response performance: neuronal correlates of transient memory. *Journal of neurophysiology*. 1973;36(1):61-78.

316. Fuster JM, Bauer RH, Jervey JP. Cellular discharge in the dorsolateral prefrontal cortex of the monkey in cognitive tasks. *Experimental neurology*. 1982;77(3):679-94.
317. Leung HC, Gore JC, Goldman-Rakic PS. Sustained mnemonic response in the human middle frontal gyrus during on-line storage of spatial memoranda. *Journal of cognitive neuroscience*. 2002;14(4):659-71.
318. Magee JC, Carruth M. Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*. 1999;82(4):1895-901.
319. Metz AE, Spruston N, Martina M. Dendritic D-type potassium currents inhibit the spike afterdepolarization in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of physiology*. 2007;581(Pt 1):175-87.
320. Miller EK. The prefrontal cortex: complex neural properties for complex behavior. *Neuron*. 1999;22(1):15-7.
321. Williams SR, Stuart GJ. Mechanisms and consequences of action potential burst firing in rat neocortical pyramidal neurons. *The Journal of physiology*. 1999;521 Pt 2:467-82.
322. Yue C, Yaari Y. KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(19):4614-24.
323. DeFelipe J, Farinas I. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in neurobiology*. 1992;39(6):563-607.
324. Feldman D. Morphology of the neocortical pyramidal neuron. In: *Cerebral Cortex: Cellular Components of the Cerebral Cortex* Plenum; 1984.
325. Chklovskii DB, Mel BW, Svoboda K. Cortical rewiring and information storage. *Nature*. 2004;431(7010):782-8.
326. Jan YN, Jan LY. Dendrites. *Genes & development*. 2001;15(20):2627-41.
327. London M, Häusser M. Dendritic computation. *Annual review of neuroscience*. 2005;28:503-32.
328. Mel BW. Why have dendrites? 2007:420-40.
329. Bannister NJ, Larkman AU. Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns. *The Journal of comparative neurology*. 1995;360(1):150-60.
330. Ito M, Kato M, Kawabata M. Premature bifurcation of the apical dendritic trunk of vibrissa-responsive pyramidal neurones of X-irradiated rat neocortex. *The Journal of physiology*. 1998;512 (Pt 2):543-53.
331. Jinno S, Kosaka T. Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neuroscience research*. 2006;56(3):229-45.
332. Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD. Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of anatomy*. 2000;196 (Pt 4):527-42.
333. Gallman JAWaEA. Rapid Review Neuroscience. 1 (30 de noviembre de 2006) ed2007. 320 páginas p.
334. Stocco A, Lebiere C, Anderson JR. Conditional routing of information to the cortex: a model of the basal ganglia's role in cognitive coordination. *Psychological review*. 2010;117(2):541-74.
335. Gurney K, Prescott TJ, Wickens JR, Redgrave P. Computational models of the basal ganglia: from robots to membranes. *Trends in neurosciences*. 2004;27(8):453-9.
336. Cajal SRy. *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates* 1995.

337. Fink JS, Weaver DR, Rivkees SA, Peterfreund RA, Pollack AE, Adler EM, et al. Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Brain research Molecular brain research*. 1992;14(3):186-95.
338. Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., et al. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*. 1990;250(4986):1429-32.
339. Parent A. *Comparative neurobiology of the basal ganglia*. New York: J. Wiley; 1986. xiv, 335 p. p.
340. Calabresi P, Mercuri NB, Bernardi G. Synaptic and intrinsic control of membrane excitability of neostriatal neurons. II. An in vitro analysis. *Journal of neurophysiology*. 1990;63(4):663-75.
341. O'Donnell P, Grace AA. Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15(5 Pt 1):3622-39.
342. Wilson CJ, Groves PM. Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain research*. 1981;220(1):67-80.
343. Yim CY, Mogenson GJ. Neuromodulatory action of dopamine in the nucleus accumbens: An in vivo intracellular study. *Neuroscience*. 1988;26(2):403-15.
344. Gerfen CR. The neostriatal mosaic. I. compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *The Journal of comparative neurology*. 1985;236(4):454-76.
345. Goldman-Rakic PS. Cytoarchitectonic heterogeneity of the primate neostriatum: Subdivision into island and matrix cellular compartments. *The Journal of comparative neurology*. 1982;205(4):398-413.
346. Penny GR, Wilson CJ, Kitai ST. Relationship of the axonal and dendritic geometry of spiny projection neurons to the compartmental organization of the neostriatum. *The Journal of comparative neurology*. 1988;269(2):275-89.
347. Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emsen PC. Intracellular recording of identified neostriatal patch and matrix spiny cells in a slice preparation preserving cortical inputs. *Journal of neurophysiology*. 1989;62(5):1052-68.
348. Zheng T, Wilson CJ. Corticostriatal combinatorics: the implications of corticostriatal axonal arborizations. *Journal of neurophysiology*. 2002;87(2):1007-17.
349. Wilson CJ, Groves PM. Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *The Journal of comparative neurology*. 1980;194(3):599-615.

12. Anexos

Anexo I - Inmunofluorescencia neuroglobina

No. de Catálogo: Sigma N7162

Cortes de parafina de 2 μ m

1. Montar los cortes en laminillas electrocargadas (Colorfrost Plus, Thermo Scientific) y enmarcar con plumón de cera
2. Añadir 200 μ L de solución de bloqueo de 1.5 a 2 horas a temperatura ambiente

Solución de Bloqueo:

-PBS - Tritón 0.3% + Albúmina Sérica Bovina 5%.

PBS inmunohistoquímica (1L de solución):

-NaCl.....8g

-Na₂HPO₄ (12H₂O).....2.9g

-KH₂PO₄.....0.2g

-KCl.....0.2g

3. Incubar primer anticuerpo primario por 24 horas a 4° C

Anticuerpo Primario anti-neuroglobina (Sigma Aldrich N7162) dilución 1:200 en solución de bloqueo

4. Lavar en PBS para inmunohistoquímica 3 veces por 5 min
5. Incubar en Anticuerpo secundario Alexa 488 rabbit (Jackson 711-585-152) dilución 1:400 por 1 hora a 4°C protegido de la luz
6. Lavar en PBS para inmunohistoquímica 3 veces por 5 min
7. Incubar el segundo anticuerpo primario por 24 hrs más:

Anticuerpo Primario anti-NeuN (Thermo Scientific PA5-37407), dilución 1:500 en solución de bloqueo

8. Lavar los cortes en PBS para inmunohistoquímica 3 veces por 5 min

9. Incubar en Anticuerpo secundario Alexa 647 anti-mouse (Jackson 115-545-146) dilución 1:400 por 1 hora a 4°C protegido de la luz
10. Lavar los cortes en PBS para inmunohistoquímica 3 veces por 5 min
11. Se montan con medio para montar inmunofluorescencia con DAPI (Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI).
12. Colocar en portaobjetos y se sella con esmalte transparente

Anexo II - Preparación de soluciones

Preparación de 1 L de PBS (0.2 M) *Rinde para 2 L de PBS (0.1M)

1. Pesar 58.03 g de fosfato disódicoanhídrido(Na_2HPO_4) en balanza analítica
2. Pesar 5.24 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) en balanza analítica
3. Colocar en un vaso de precipitados 600 mL de agua destilada y un agitador magnético
4. Colocar el vaso de precipitados en la parrilla de agitación (sin calentamiento) y comenzar a agitar el agua
5. Agregar al agua en agitación la cantidad pesada de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) (5.24g)
6. Una vez disuelta ésta sal adicionar la cantidad pesada de fosfato disódicoanhídrido (Na_2HPO_4) (58.03g)
7. Continuar con la agitación hasta disolución total del fosfato disódicoanhídrido(Na_2HPO_4).
8. Medir pH con potenciómetro (Se debe ajustar el pH de la solución de PBS a 7.4, ya sea con la adición de gotas de solución de ácido clorhídrico (1M) para bajar el pH o con la adición de gotas de solución de hidróxido de sodio (1M) para subir el pH). *Durante el ajuste del pH el electrodo debe estar al

interior de la solución y la agitación debe ser suave, evitando la formación de burbujas. *Checar apartado para medición de pH.

9. Una vez ajustado el pH, parar la agitación y extraer el agitador magnético del vaso de precipitados.

10. Vaciar la solución obtenida en una probeta de 1L y aforar con agua destilada hasta este volumen precisamente (1L).

11. Una vez aforada la probeta, regresar la solución al vaso de precipitados utilizado y agitar nuevamente la solución por 1 min (con agitador de vidrio).

PBS 0.1 M

12. Vaciar 500 mL de esta solución en una probeta de 1 L limpia y aforar con agua destilada a 1000 mL.

13. Hacer lo mismo con los 500 mL de solución de PBS restantes.

14. Filtrar los dos litros con ayuda de un embudo y papel filtro y recibirlos en recipientes limpios. *Durante la filtración la cantidad de solución agregada al papel no debe sobrepasar los bordes del papel, para lograr una solución libre de partículas.

15. Una vez filtrados ambos litros, rotular los recipientes con lo siguiente:

Solución de PBS 0.1 M Filtrada.

Preparación de 100 mL de solución de ácido clorhídrico (1 M) para ajuste de pH

1. En un vaso de precipitados de 50 mL colocar 40 mL de agua destilada.

2. Adicionar a este volumen de agua con pipeta graduada (PERFECTAMENTE LIMPIA) 8.3 mL de Ácido Clorhídrico al 37%. *Hacer este paso en la campana de extracción para evitar la inhalación de vapores y hacer la adición del ácido al agua de forma lenta.

3. Vaciar el contenido del vaso de precipitados, cuidadosamente, en un matraz volumétrico de 100 mL.
4. Aforar el matraz.
5. Sellar con parafilm el matraz para evitar derrames y agitar suavemente la solución invirtiendo el matraz (dos o tres veces). *Poner dedo índice en la boca del matraz tras poner el parafilm al estar agitando.
6. Vaciar en un recipiente para almacenar la solución
7. Rotular como sigue:

Solución de HCl 1M

*Nunca adicionar el ácido al vaso primero y luego agregar el agua (40mL).

Preparación de 100 mL de solución de hidróxido de sodio (1 M) para ajustar pH

1. Pesar 4 g de hidróxido de sodio (granallas)
2. En un vaso de precipitados de 50 mL colocar 40 mL de agua destilada.
3. Adicionar a este volumen de agua la cantidad pesada de hidróxido de sodio.
4. Comenzar a agitar con agitador de vidrio. *Sostener vaso de precipitados con franela, ya que la reacción resulta ser exotérmica (genera mucho calor).
5. Continuar agitando hasta disolución total de la base.
6. Vaciar el contenido del vaso de precipitados, cuidadosamente, en un matraz volumétrico de 100 mL.
7. Aforar el matraz.
8. Sellar con parafilm el matraz para evitar derrames y agitar suavemente la solución invirtiendo el matraz (dos o tres veces). *Poner dedo índice en la boca del matraz tras poner el parafilm al estar agitando.
9. Vaciar en un recipiente para almacenar la solución

10. Rotular como sigue:

Solución de NaOH 1M

Preparación de 1 L de Paraformaldehído 4%

1. Pesar 40 g de paraformaldehído en balanza analítica
2. Colocar en un vaso de precipitados 300 mL de agua destilada y un agitador magnético
3. Colocar el vaso de precipitados en la parrilla de agitación (con calentamiento) y comenzar a agitar el agua. *Este volumen debe alcanzar una temperatura de 70° C (hacer esto en la campana de extracción)
4. Una vez alcanzada la temperatura deseada adicionar la cantidad pesada de paraformaldehído y tapar vaso con aluminio para evitar evaporación.
5. Mantener la temperatura y la agitación de manera constante por 20 a 30 min.

*Se observará una solución turbia de aspecto jabonoso.

6. Agregar dos granallas de hidróxido de sodio a la solución y mantener agitación.

*Se aclarará la solución dándole un aspecto traslucido.

7. Dejar enfriar y dejar de agitar la solución.
8. Vaciar en una probeta de 500 mL la solución de paraformaldehído preparada y enjuagar vaso de precipitados (donde se preparó la solución) con agua destilada (solo la necesaria para aforar la probeta a 500mL).
9. Preparar la otra parte de la solución como se indica a continuación:

Preparación de 500 mL de PBS (0.2 M)

1. Pesar 29.01 g de fosfato disódicoanhídrido (Na_2HPO_4) en balanza analítica

2. Pesar 2.62 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) en balanza analítica
3. Colocar en un vaso de precipitados 300 mL de agua destilada y un agitador magnético
4. Colocar el vaso de precipitados en la parrilla de agitación (sin calentamiento) y comenzar a agitar el agua
5. Agregar al agua en agitación la cantidad pesada de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) (2.62 g)
6. Una vez disuelta ésta sal adicionar la cantidad pesada de fosfato disódicoanhídrido (Na_2HPO_4) (29.01 g)
7. Continuar con la agitación hasta disolución total del fosfato disódicoanhídrido (Na_2HPO_4).
8. Medir pH con potenciómetro (Se debe ajustar el pH de la solución de PBS a 7.4, ya sea con la adición de gotas de solución de ácido clorhídrico (1M) para bajar el pH o con la adición de gotas de solución de hidróxido de sodio (1M) para subir el pH). *Durante el ajuste del pH el electrodo debe estar al interior de la solución y la agitación debe ser suave, evitando la formación de burbujas. *Checar apartado para medición de pH.
9. Una vez ajustado el pH, parar la agitación y extraer el agitador magnético del vaso de precipitados.
10. Vaciar la solución obtenida en una probeta de 500 mL y aforar con agua destilada hasta este volumen precisamente (500 mL).
11. Mezclar los 500 mL de la solución de paraformaldehído preparada con los 500 mL de esta solución en un vaso de precipitados de 1 L y nuevamente medir pH. *Debe conservarse el valor de 7.4, de no ser así ajustar nuevamente.
12. Filtrar mezcla con ayuda de un embudo y papel filtro y recibirlos en recipientes limpios. *Durante la filtración la cantidad de solución agregada al

papel no debe sobrepasar los bordes del papel, para lograr una solución libre de partículas. *Hacerlo en campana de extracción

13. Una vez filtrada la solución, rotular el recipiente con lo siguiente:

Solución de paraformaldehído al 4% Filtrada.

Anexo III - Calibración de equipo

Potenciómetro

1. Encender equipo
2. Presionar Clear por dos segundos
3. Conectar el electrodo de pH al equipo
4. Enjuagar electrodo en agua destilada y secarlo con papel de baño *Con mucho cuidado sin tocar la membrana del electrodo.
5. Sumergir electrodo en la primer solución buffer (pH de 7). Medir temperatura del buffer con termómetro y ajustar esta temperatura en el equipo con ayuda de las flechas up and down.
6. Presionar el botón Stand por 5 segundos para calibrar. (La palabra WAIT aparecerá y desaparecerá hasta que el equipo detecte una lectura estable).
7. Una vez calibrado el primer punto, este dejara de parpadear en la pantalla, mientras los dos puntos restantes permanecen intermitentes.
8. Sacar electrodo del buffer, secarlo y enjuagarlo nuevamente en agua destilada.
9. Secar nuevamente y sumergir electrodo en la segunda solución buffer.
10. Medir temperatura del buffer con termómetro y ajustar esta temperatura en el equipo con ayuda de las flechas up and down.
11. Presionar Slope, para calibrar. (La palabra WAIT aparecerá y desaparecerá hasta que el equipo detecte una lectura estable).

12. Una vez calibrado el segundo punto, este dejara de parpadear en la pantalla, mientras el punto restante permanece intermitente.
13. Nuevamente, sacar electrodo del buffer, secarlo y enjuagarlo nuevamente en agua destilada.
14. Secar y sumergir electrodo en la tercera solución buffer.
15. Medir temperatura del buffer con termómetro y ajustar esta temperatura en el equipo con ayuda de las flechas up and down.
16. Presionar Slope, para calibrar. (La palabra WAIT aparecerá y desaparecerá hasta que el equipo detecte una lectura estable).
17. Una vez calibrado el tercer punto, el equipo saldrá automáticamente del modo de calibración.
18. Presionar y mantener apretado Mea/Eff por 5 segundos.
19. El electrodo está listo para usarse.