

**“Función de las Metalotioneínas en el metabolismo  
celular de cobre”**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

Por

**Lucía M. Tapia Alamos**

**Octubre, 2002**

**Directores de tesis:  
Dr. Ricardo Uauy  
Dr. Mauricio González**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

**Lucía Marcela Tapia Alamos**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 30 de septiembre del año 2002.

**Directores de Tesis:**

Dr. Ricardo Uauy D.

---

Dr. Mauricio González C.

---

**Comisión de evaluación de Tesis:**

Dra. María Rosa Bono.

---

Dr. M. Tulio Núñez.

---

Dr. Ariel Orellana.

---

Dr. Luis Valladares.

---

A mis padres, por su paciencia y porque siempre están.

A Hartley, por ser mi amigo y desafiar mis límites, y a nuestra hija  
Iuliana, por recordarme cuales son las cosas importantes en la vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. Ricardo Uauy por recibirme como tesista de doctorado sin conocerme y en épocas difíciles de mi vida. Agradezco su apoyo académico y profesional, el que ha sido clave para el desarrollo de esta tesis y para mi proyección profesional.

Agradezco al Dr. Mauricio González por las innumerables horas de trabajo conjunto, las que han generado mucho más que una tesis doctoral. Su constante dedicación y ejemplo han sido determinante en mi aprendizaje de la vida científica y en mi compromiso profesional.

Agradezco a la Dra. Verónica Cambiazo, por enseñarme biología molecular, a presentar un trabajo científico y por ser un ejemplo de profesionalismo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, Miriam, Mónica, Talía, Mauricio, Christian, Hans, por su ayuda, apoyo y paciencia.

Agradezco a todos los que aportaron y facilitaron mi proceso desde el aspecto académico, laboral y de manejo de laboratorio. Agradezco a todos ellos en las personas del Dr. Jorge Martínez, la Dra. Cecilia Rojas, Dr, Juan Fco. Santibáñez, de los muchachos del laboratorio de Biología Celular del INTA , de Paula y de José.

Agradezco a las chicas del INTA, Mireya A, Lorena SM, Jessica M, Miriam S, Mónica C, Angélica L, Angélica A y Nora D, porque gracias a su amistad se disfrutaron mejor los logros y se soportaron mejor los fracasos.

Agradezco al Dr. Nibaldo Inestrosa y a Eliseo Campos, por representar el inicio, sin el cual no habría un final.

## INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	1
INDICE DE TABLAS	5
INDICE DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS	8
RESUMEN	10
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 El Cobre y su estado redox en los sistemas biológicos	17
1.2 Proteínas Transportadoras de Cobre en el Plasma	19
1.3 Incorporación de Cobre a la Célula	21
1.4 Chaperonas	24
1.5 GSH	26
1.6 Transportadores	27
1.7 Metalotioneinas	32
1.7.1 Estructura	32
1.7.2 Secuencia y Expresión Génica	33
1.7.3 Funciones Propuestas en el Metabolismo de Metales	35
1.8 Hipótesis y Objetivos	40
2. MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.1. Material biológico	42
2.1.1 Células eucarióticas	42
2.1.2 Bacterias	43
2.1.3 Plasmidios	43
2.1.4 Partidores	44
2.1.5 Anticuerpos	46

2.2. Reactivos	47
2.2.1 Medios y suplementos de cultivo	47
2.2.2 Enzimas	47
2.2.3 Marcadores de peso molecular	47
2.2.4 Material radioactivo	48
2.2.5 Reactivos generales	48
2.3 Métodos	49
2.3.1. Cultivo de líneas de mamíferos	49
2.3.2. Western blot	50
2.3.3. Inmunofluorescencia indirecta	54
2.3.4. Exposición de líneas celulares a cobre	54
2.3.5. Cuantificación de viabilidad celular	55
2.3.6. Contenido de GSH	57
2.3.7. Contenido celular de cobre, hierro y zinc	57
2.3.8. Incorporación celular de cobre	59
2.3.9. Excreción celular de cobre	60
2.3.10. Centrifugación diferencial de homogenizados celulares	60
2.3.11. Cuantificación de proteínas	61
2.4. Métodos de biología molecular	61
2.4.1. Mantención de cultivo de bacterias	62
2.4.2. Extracción de DNA plasmidial	62
2.4.3. Extracción de RNA de líneas celulares	63
2.4.4. Cuantificación de DNA y RNA	64
2.4.5. Electroforésis en geles de agarosa	64
2.4.6. Electroforésis en geles de acrilamida	64
2.4.7. Digestión de vectores con enzimas de restricción	65
2.4.8. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa	65
2.4.9. Precipitación de DNA	66
2.4.10. Ligación de fragmentos de DNA en un vector	66

2.4.11. Transformación de cepas bacterianas	66
2.4.12. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	67
2.4.13. PCR Semicuantitativo	68
2.4.14. Macroarreglo	69
2.4.15. Análisis estadístico	71
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>72</b>
3.1.-Líneas de fibroblastos silvestres y mutantes para MT I/II.	72
3.1.1. Contenido de metales traza en el medio de cultivo.	72
3.1.2. La ausencia de MT no modifica la morfología celular ni la tasa de crecimiento de fibroblastos mantenidos en cultivo a concentraciones sub-fisiológicas de Cu.	74
3.1.4. Los fibroblastos mutantes expresan una forma alterada de la isoforma I del gen de MT.	76
3.1.5. Los fibroblastos mutantes no expresan la proteína de MT.	77
3.1.6. La expresión de la proteína de MT es inducida por Cu en fibroblastos silvestres.	79
3.1.7. Fibroblastos mutantes tienen un menor contenido basal de GSH y su contenido no cambia en respuesta a la exposición a Cu.	81
3.1.8. Fibroblastos mutantes y silvestres crecidos en condiciones basales de cultivo tienen igual contenido Cu, Fe y Zn.	83
3.2. Análisis de la viabilidad celular y del contenido de metales traza en fibroblastos mutantes y silvestres expuestos a Cu.	86
3.2.1. Fibroblastos silvestres son más resistentes frente a la exposición a concentraciones supra-fisiológicas de Cu que los fibroblastos mutantes.	86
3.2.2. Fibroblastos silvestres acumulan Cu a una tasa mayor que los fibroblastos mutantes a concentraciones iso- y supra-fisiológica de Cu.	88
3.2.3. Fibroblastos mutantes son más sensibles a menor contenido intracelular de Cu que los fibroblastos silvestres.	94
3.3. Análisis de la incorporación y excreción de Cu de los fibroblastos en cultivo.	96

3.3.1. La incorporación de Cu en los fibroblastos en cultivo no es modulada por MT.	96
3.3.2. MT no afecta la tasa de excreción de <sup>64</sup> Cu en los fibroblastos en cultivo.	100
3.3.3. MT modula la ruta de excreción de Cu en los fibroblastos en cultivo.	104
3.4. Análisis de la distribución subcelular de Cu en los fibroblastos en cultivo.	112
3.5. Regulación de la expresión de MT y otros genes asociados al metabolismo de Cu en fibroblastos silvestres y mutantes.	116
3.5.1. En ausencia de MT, se pierde la inducción de MT en respuesta a la exposición a Cu.	116
3.5.2. La expresión del mRNA de la isoforma I de MT no se induce por la exposición a una concentración supra-fisiológica de Cu en los fibroblastos mutantes.	121
4. DISCUSIÓN	123
5. CONCLUSIONES	140
6. BIBLIOGRAFIA	144

**INDICE DE TABLAS**

Tabla 1.-Concentración basal de Cu, Fe y Zn en el medio de cultivo y en el plasma.	73
Tabla 2.- Contenido de <sup>64</sup> Cu (pmoles/ mg proteína) en fibroblastos mutantes y silvestres expuestos a 5 μM <sup>64</sup> Cu-His.	89
Tabla 3.- Parámetros cinéticos de la incorporación de Cu en los fibroblastos en cultivo.	98
Tabla 4.- Distribución Subcelular del Cu medido en pmoles totales acumulado en fibroblastos tratados con 200 μM de <sup>64</sup> Cu-His por 3 y 24 h.	115
Tabla 5.- Lista de genes y de su función propuesta utilizados en la construcción del Macroarreglo.	117

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Modelo de las moléculas que participan en el metabolismo celular de Cu.	20
FIGURA 2. Morfología de fibroblastos mutantes y silvestres.	75
FIGURA 3. Tasa de crecimiento de fibroblastos silvestres y mutantes.	75
FIGURA 4. Amplificación por PCR de un transcrito correspondiente a la isoforma I del gen de MT.	77
FIGURA 5.- Análisis de la expresión de la proteína de MT en líneas celulares de mamífero en cultivo.	79
FIGURA 6.- Análisis de la inducción de la proteína de MT por la exposición a Cu de fibroblastos en cultivo.	80
FIGURA 7.- Contenido de GSH en fibroblastos tratados con Cu.	82
FIGURA 8.- Contenido de metales traza en líneas celulares de mamíferos.	84
FIGURA 9.- Contenido de Cu, Fe y Zn en fibroblastos mutantes (804) y silvestres (805).	85
FIGURA 10.- Viabilidad celular en fibroblastos tratados con concentraciones supra-fisiológicas de Cu-His.	87
FIGURA 11.- Contenido de Cu en fibroblastos expuestos a Cu-His.	91
FIGURA 12.- Contenido de Fe y Zn en fibroblastos expuestos a Cu.	92
FIGURA 13.-. Contenido de Fe en células Caco2 y HepG2 expuestas a Cu.	93
FIGURA 14.- Relación entre viabilidad celular y contenido de Cu intracelular.	95
FIGURA 15.- Dependencia del tiempo y de la concentración de Cu extracelular en la tasa de incorporación del metal.	97

FIGURA 16.- Gráfico de doble recíproco para la incorporación de Cu de las líneas de fibroblastos mutantes y silvestres.	99
FIGURA 17.- Incorporación de Cu en fibroblastos pre-expuestos a Cu extracelular.	100
FIGURA 18.- Excreción de $^{64}\text{Cu}$ en fibroblastos en cultivo.	101
FIGURA 19.- Retención de $^{64}\text{Cu}$ en fibroblastos pre-tratados con Cu-His.	103
FIGURA 20.- Dependencia de la temperatura en la retención de $^{64}\text{Cu}$ en los fibroblastos expuestos a una concentración fisiológica de Cu.	106
FIGURA 21.- Dependencia de la temperatura en la retención de $^{64}\text{Cu}$ en los fibroblastos expuestos a una concentración supra-fisiológica de Cu.	107
FIGURA 22.- Localización del transportador ATP7A en fibroblastos mutantes y silvestres.	108
FIGURA 23.- Expresión de la proteína ATP7A en los fibroblastos expuestos a 0 y 250 $\mu\text{M}$ de Cu-His.	110
FIGURA 24.- Distribución subcelular del Cu recién incorporado.	113
FIGURA 25.- Distribución subcelular del Cu recién incorporado (en pmoles totales).	114
FIGURA 26.- Patrón de expresión de genes relacionados con el metabolismo celular de Cu.	119
FIGURA 27.- Cambio en la expresión de genes relacionados con el metabolismo celular de Cu en fibroblastos expuestos a una concentración supra-fisiológica del metal.	120
FIGURA 28.- Inducción de la expresión del mRNA de MT I por Cu.	122

## ABREVIATURAS

aa:	aminoácidos
AAS:	espectrometría de absorción atómica
APP:	proteína precursora del amiloide
Atox1:	chaperona de ATP7A y ATP7B
ATP7A:	ATPasa transportadora de Cu en tejidos no-hepático
ATP7B:	ATPasa transportadora de Cu en tejido hepático
BCS:	sulfato de batocupreína
BSA:	albúmina de suero bovino
CMV:	citomegalovirus
CAPS:	ácido ciclohexilamino-propanosulfónico
CCO:	citocromo c oxidasa
Ccs1:	chaperona de SOD1
Cp:	ceruloplasmina
CTR1:	transportador de Cu <sup>+1</sup>
Cu:	cobre
DMEM:	medio Eagle modificado por Dulbecco
DMT1:	transportador de cationes divalentes
DMSO:	dimetilsulfóxido
DNA:	ácido desoxirribonucleico
cDNA:	DNA complementario
DS:	desviación estándar
Fe:	hierro
h:	hora
IgG:	inmunoglobulina tipo G
IL:	interleuquinas
kb:	kilobase

Kd:	constante de disociación
kDa:	kilo Daltones
LDH:	lactato deshidrogenasa
LMP:	agarosa de bajo punto de fusión ( <i>low melting point</i> )
Lox:	lisil oxidasa
Lys17:	chaperona de CCO
min:	minutos
MD:	Enfermedad de Menkes
MT:	metalotioneina
NMR:	Resonancia magnética nuclear
nt:	nucleótidos
dNTPs:	desoxinucleótidos
pb:	pares de bases
PBS:	tampón fosfato salino
PCR:	reacción de la polimerasa en cadena
PrP:	proteína prion
RNA:	ácido ribonucleico
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero
SDS:	dodecil sulfato de sodio
SFB:	suero fetal bovino
SOD1:	superóxido dismutasa dependiente de Cu y Zn
TEMED:	N, N, N', N' –tetrametiletildiamina
TS:	tampón Tris salino
TST:	0.05% Tween-20 en TS
Tris:	tris (hidroximetil) aminometano
TXRF:	fluorescencia de reflexión total de rayos X
WD:	Enfermedad de Wilson
Zn:	zinc

## RESUMEN

El Cu es un micro nutriente esencial para el desarrollo de la vida de organismos tan diversos como bacterias, levaduras, plantas y mamíferos, incluyendo al hombre. La esencialidad de este metal se deriva de su capacidad de ser un intermediario en la transferencia de electrones, por lo que es utilizado por diversas enzimas con actividad redox que participan en procesos fisiológicos como la respiración celular, el metabolismo y transporte de hierro a través de membranas y la síntesis de neurotransmisores. Por otro lado, en consecuencia de esta propiedad redox, el Cu es un elemento potencialmente tóxico, dado que puede generar, por reacciones de tipo Fenton, daño celular a membranas, DNA y proteínas. Para evitar tanto el déficit como el exceso, los organismos han generado mecanismos que regulan el nivel de Cu circulante y las reservas, a través de la especialización de tejidos como la mucosa intestinal e hígado. En las células, existen diversas moléculas involucradas en la homeostasis de Cu, las que regulan la entrada, la salida, el almacenamiento y la utilización intracelular del metal. Las evidencias indican que el manejo del Cu está finamente regulado, de forma tal, que en condiciones normales la probabilidad de encontrar un ión de Cu libre dentro de la célula es casi nula.

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas claves involucradas en el manejo intracelular del Cu. Éstas se expresan tanto en procariontes como

eucariontes, y su estructura es altamente conservada. Sus propiedades fisicoquímicas le permiten coordinar la unión de múltiples átomos de Cu con una alta afinidad y, al mismo tiempo, tener la labilidad cinética necesaria para entregar alguno de ellos. La expresión de MT es inducida por Cu, y su expresión se relaciona con un aumento en la resistencia frente a la toxicidad generada por el metal. Estas propiedades sugieren que MT tiene un papel importante en el manejo intracelular de Cu a través del almacenamiento y/o la transferencia del metal a metaloproteínas específicas. Dado que su papel en el metabolismo celular de Cu no ha sido completamente establecido, el objetivo de esta tesis doctoral fue evaluar su función en el metabolismo celular de Cu en células mantenidas a concentraciones sub-, iso- y supra-fisiológicas del metal.

Los resultados de esta tesis indican que, en ausencia de MT, las células en cultivo mantenidas a una concentración iso- y supra-fisiológica de Cu, tienen una capacidad disminuida de almacenar el metal. A pesar de su menor contenido, las células que carecen de MT son más sensibles a un aumento en el contenido interno de Cu, disminuyendo su viabilidad frente a la exposición al metal. La diferencia en el contenido intracelular, respecto a las células silvestres, no es explicada por un cambio en la tasa de incorporación, sugiriendo que debe haber una disminución en la tasa de salida. El análisis de la excreción de la población de Cu recién incorporado indica que en ausencia de MT, la retención de esta población de Cu es levemente menor, lo que en condiciones de exposición prolongada, podría explicar, al menos en parte, el

menor contenido de Cu en las células que no expresan MT. Finalmente, se observó que, en ausencia de MT, se altera la inducción por Cu de la expresión de MT, SOD1 y su chaperona Ccs1. Esto podría explicar en parte, la mayor sensibilidad de células nulas a un menor contenido intracelular del metal. Como conclusiones de esta tesis, propongo que la presencia de MT es importante para mantener una apropiada regulación homeostática del Cu intracelular, en las células mantenidas a una concentración fisiológica y especialmente en respuesta a un exceso de Cu extracelular. Dicha respuesta depende de la capacidad de MT de almacenar Cu en forma fisiológica, y frente al exceso secuestrar el Cu intracelular en forma segura.

## ABSTRACT

Copper is an essential micronutrient for life, it is required by a wide range of species, from bacteria to yeast, plant and humans. Copper essentiality is based in the capacity of the metal to be an intermediary in the transfer of electrons; thus, redox active enzymes that participate in physiological process like cellular respiration, iron transport and metabolism, and neurotransmitter synthesis utilize it. On the other hand, as a consequence of its redox properties, copper is potentially toxic to membranes, DNA and proteins through a Fenton's type reaction. To prevent excess or deficit, living organisms have developed mechanisms that regulate copper in plasma and tissue stores, through specialized tissues such as intestinal mucosa and hepatic tissue. A number of molecules at a cellular level regulate the uptake, efflux, storage and utilization of the metal. The evidence indicates that copper handling is tightly regulated, thus, under normal conditions it is almost impossible to find a free copper ion inside the cell.

Metallothioneins (MTs) are proteins involved in the regulation of intracellular copper metabolism. MTs are found in all eukaryots as well as some prokaryots; the structure is highly conserved across species. Physical-chemical properties allow MTs to coordinate the binding of multiple atoms of copper with a high affinity, and at the same time since these are kinetically labile they can

be transferred to other molecules. Copper induces MT expression, thus intracellular MT content is related to an increase in cell resistance to copper toxicity. These properties suggest that MTs have an important role in cellular copper metabolism, storage and/or delivery of copper ions to specific cupro-enzymes. Since the role of MT has not been fully characterized, the goal of this doctoral thesis was to evaluate MT function in copper metabolism of cells maintained in sub, iso- and supra- physiological concentrations of copper.

The results of this thesis indicate that in the absence of MT, cultured cell grown in low and normal concentration of copper have a decreased capacity to store copper; moreover they are more sensitive to an increment in intracellular copper, decreasing their viability. The increment in intracellular copper relative to wild cells is not explained by an increase in copper uptake, suggesting a difference in the efflux rate. The analysis of efflux of newly incorporated copper showed that in absence of MT, the retention of this copper is slightly lower; this may explain in part, the lower copper content observed in these cells. Finally, I have demonstrated that in the absence of MTs, the capacity of copper to induce gene expression of MT, SOD1 and Ccs1 its chaperone is lost. This observation could partially explain the increased vulnerability of MT null cells to lower intracellular copper concentrations. I propose as conclusions of this thesis that the presence of MT is important to maintain an appropriate regulation of intracellular copper homeostasis in cells grown at physiological copper concentrations and especially in response to extracellular copper excess. This response is dependent on the capacity of MT to store copper under

physiological conditions and in response to excess, sequester intracellular copper in a safe form.

## INTRODUCCIÓN

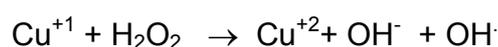
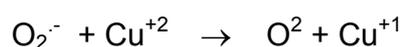
El Cobre (Cu) es un elemento traza esencial para la vida de todos los organismos eucariontes (desde levaduras hasta el hombre) y de algunos procariontes (Hamer, 1986). Su importancia radica en su propiedad redox, la cual es utilizada por diversas enzimas para su función catalítica. Sin embargo, el Cu es un elemento potencialmente tóxico, dado que puede generar, por reacciones de tipo Fenton, daño celular a membranas, DNA y proteínas (Jauy y cols, 1998). En el ámbito de la biología celular, se ha descrito la actividad de diversos mecanismos fisiológicos destinados a mantener un suministro adecuado del metal y al mismo tiempo, controlar su exceso. Estos mecanismos de homeostasis celular de Cu están destinados a controlar la entrada, el almacenamiento (cantidad y localización) y la salida del metal de la célula (Linder, 2002). Uno de los elementos involucrados en el manejo intracelular de Cu son la metalotioneínas (MTs) (Hamer, 1986, Bremner y Beattie, 1990). Estas proteínas tienen características fisicoquímicas muy particulares y su estructura es altamente conservada, sugiriendo que tienen un papel importante a través de la evolución. Fisiológicamente, la MT liga múltiples átomos de Cu y de Zn. Se ha demostrado *in vitro* que las MTs unen los átomos de Zn con una alta afinidad, pero con la labilidad cinética necesaria para entregar algunos de

estos átomos a metaloproteínas específicas (Jiang y cols 1998). La capacidad de transferencia de Cu ha sido demostrada *in vitro* en la reconstitución de la actividad de apo-SOD en presencia de Cu-MT (Liu y cols, 2000). La expresión de MT se relaciona con el aumento en la resistencia celular a la toxicidad subyacente a la exposición a Cu, aun cuando su función biológica no ha sido bien establecida. Dado que se desconoce el mecanismo por el cual estas proteínas protegen a la célula, el propósito de esta tesis doctoral ha sido analizar con profundidad la función de MT, tanto a concentraciones sub-, iso- como supra-fisiológicas de Cu.

### **El Cobre y su estado redox en los sistemas biológicos**

El Cu es un metal de transición con capacidad de generar ciclos de oxidación y reducción en la presencia de oxígeno molecular. Su importancia radica en que su propiedad redox es utilizada en un gran número de vías metabólicas de enzimas oxidasas y oxigenasas. En estas reacciones, Cu es parte del sitio catalítico de la enzima y su interacción con oxígeno esta estrictamente controlada por su entorno proteico. Entre estas enzimas están la citocromo c-oxidasa, la lisil oxidasa, la superóxido dismutasa (SOD1), la catecol oxidasa, la Dopamina  $\beta$ -monooxigenasa y la amino oxidasa (Uauy y cols, 1998). La citocromo c-oxidasa contiene tres átomos de Cu que participan en la generación del gradiente de protones en la membrana interna de la mitocondria durante la respiración celular (Steffens y cols, 1987). En el modelo surgido a

partir de estudios estructurales de la SOD1, se propone que la dismutación del anión superóxido ocurre por la reducción y oxidación de un átomo de Cu localizado en su sitio activo (Tainer y cols, 1983). Estas 2 proteínas son ejemplos de la participación de Cu en la actividad enzimática de proteínas con actividad redox involucradas en diversos procesos fisiológicos como la respiración celular, la síntesis de neurotransmisores, la defensa contra radicales libres, el metabolismo de hierro, la síntesis de melanina, la biosíntesis de tejido conectivo, etc (Ralph y McArdle, 2001). Estas actividades hacen del Cu un elemento traza esencial para el desarrollo de una amplia variedad de organismos. Por otro lado, como consecuencia de la misma propiedad redox, el metal puede ser extremadamente tóxico cuando es liberado de su matriz proteica. El Cu en su forma reducida puede directamente interactuar con oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, ambos presentes en las células como resultado normal de su metabolismo.

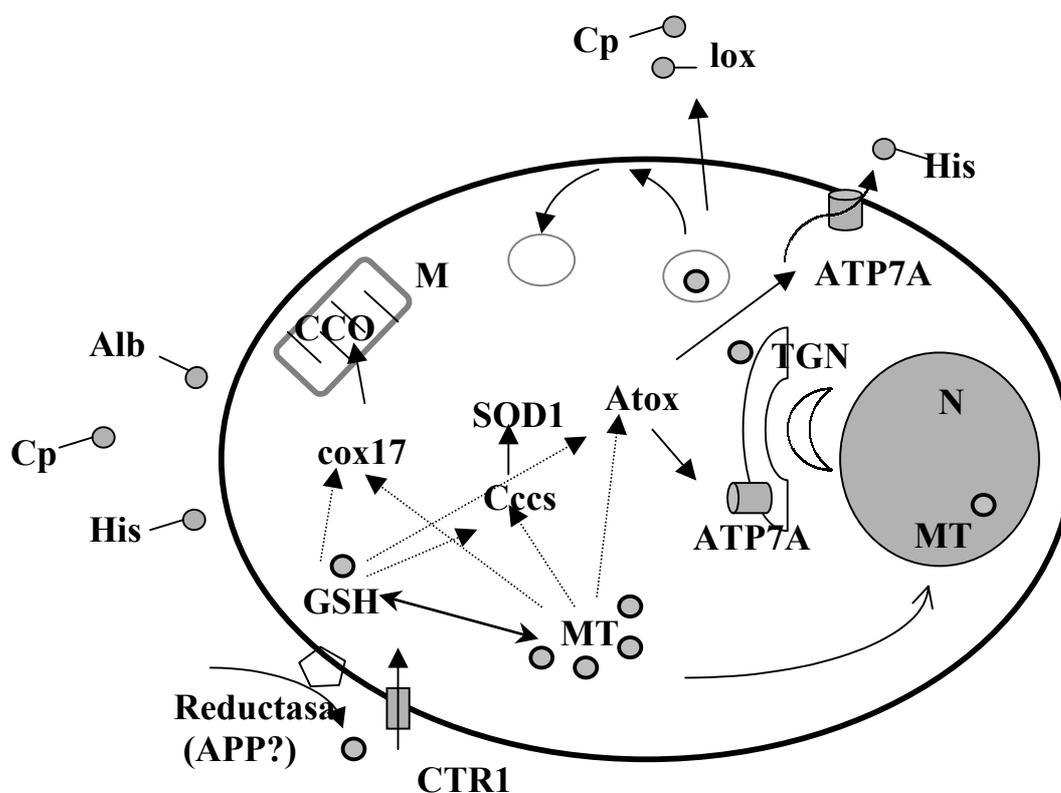


En estas interacciones el Cu actúa como un catalizador de tipo Fenton para producir radicales superóxido y por la reacción de Harber-Weiss catalizar la formación de radicales hidroxilo (Bremner, 1998) generando estrés oxidativo (Stohs y Bagchi 1995, Kawai y cols, 2000). La consecuencia más común de este daño oxidativo es la lipoperoxidación de membranas. Se ha demostrado en ratas alimentadas con altas concentraciones de Cu, la acumulación de Cu

en el tejido hepático y la consecuente peroxidación de los lípidos de la membrana mitocondrial, particularmente de la membrana interna (Sokol y cols, 1990). También se ha observado daño sobre el DNA (Bar-Or y Winkler, 2002) y por lipoperoxidación sobre las membranas lisosomales de los hepatocitos de ratas alimentadas con un exceso de Cu (Myers y cols, 1993).

### **Proteínas Transportadoras de Cobre en el Plasma**

El Cu esta siempre unido a proteínas en los sistemas biológicos (Figura 1). En mamíferos, se ha estimado que sobre el 90% del Cu incorporado a través de la dieta está unido a ceruloplasmina (Cp) luego de pasar por la circulación portal (Linder y cols, 1998). La Cp pertenece a la familia de las oxidasas con múltiples átomos de Cu. Esta proteína de 132 kDa presenta 6 sitios de unión a Cu. El estudio de la estructura de la enzima humana mostró que tres de los átomos de Cu están en un arreglo “trinuclear”, los otros 3 en un arreglo “mononuclear” y que hay otros dos sitios de unión a Cu que son lábiles que están ocupados el 50% de tiempo (Zaitsev y cols, 1999). Su estructura es muy similar a la Fet3, una oxidasa de levaduras con múltiples átomos de Cu que es esencial para la absorción de alta afinidad de Fe (Blackburn y cols, 2000). Dada la alta abundancia de Cp en el suero, y su alto contenido de Cu, varios investigadores han propuesto a esta proteína como la principal fuente de Cu celular. Sin embargo, la biodisponibilidad del Cu que contiene Cp es controversial. Linder y cols, 1998 sostienen que el Cu radiactivo que se incorpora por la dieta es unido inicialmente a moléculas como la albúmina y la



**Figura 1.- Modelo de las moléculas que participan en el metabolismo celular de Cu.**

Las abreviaturas corresponden a

Cp: ceruloplasmina

His: histidina

Alb: albúmina

APP: proteína precursora del amiloide

MT: metalotioneína

Cox17, Ccs1 y Atox1: chaperonas de CCO, SOD1 y ATP7A

CCO: citocromo c oxidasa

SOD1: superóxido dismutasa

ATP7A: transportador de Cu del tejido no hepático

Lox: lisil oxidasa

M: mitocondria

N: núcleo

TGN: red trans del ap. de Golgi

\*Las relaciones moleculares del Cu con estas proteínas, son descritas en el texto de la Introducción.

transcupreína y que en una segunda fase, luego de pasar por el hígado, más del 90% está unido a Cp. Posteriormente, la marca radioactiva se puede encontrar distribuida en diferentes tejidos. Por otro lado, [Meyer y cols, 2001](#), en estudios en ratones aceruloplasminémicos, no observaron diferencias en la absorción gastrointestinal de Cu, la absorción hepática, la excreción biliar, ni el contenido de Cu en tejidos como cerebro, corazón, vesícula o riñón respecto a los ratones silvestres. Sí encontraron una aumentada concentración de Cu en el hígado de los ratones mutantes, consecuente con la idea de que el Cu hepático es utilizado en la biosíntesis de Cp. El 10% restante del Cu no unido a Cp está unido a otras proteínas o aminoácidos principalmente albúmina, transcupreína o histidina. En estudios en cultivos primario de hepatocitos muestran que la absorción de Cu en presencia de histidina es mayor a la absorción de Cu solo o en presencia de albúmina ([McArdle y cols, 1988](#), [Darwish y cols, 1984](#)). De esta manera, se recomienda el uso de histidina en estudios de absorción de Cu en células en cultivo, por la formación de un complejo fisiológico. Se ha propuesto que histidina aumenta la solubilidad de Cu ([Mas y Sarkar, 1992](#)).

### **Incorporación de Cobre a la Célula**

La incorporación de Cu a la célula requiere de la presencia de proteínas transportadoras en la membrana celular ([Figura 1](#)). Hasta la fecha se han descrito dos tipos de transportadores de Cu, CTR1 (transportador de Cu 1) específico para Cu (I) y DMT1 un transportador de cationes divalentes (DMT1) que potencialmente puede movilizar Cu(II). En mamíferos, CTR1 fue

identificado por estudios de complementación en levadura y por homología de secuencia. Este transportador presenta una alta homología entre especies (humano, murino y levaduras) y se expresa en todos los tejidos analizados, especialmente hígado y riñón (Zhou y Gitschier, 1997, Lee y cols, 2000). Estudios bioquímicos del transportador en humanos, hCTR1, han mostrado que esta proteína une Cu con una alta afinidad, transporta específicamente  $\text{Cu}^{+1}$  y que este proceso es independiente de energía (Lee y cols, 2002). La inactivación del gen de CTR1 en ratón produce la muerte durante el desarrollo intrauterino, demostrando por un lado la esencialidad del Cu durante el desarrollo, y además, que la expresión de este transportador es fundamental para la adquisición del metal en condiciones normales de crecimiento (Lee y cols, 2001).

Dado que el Cu se transporta en el plasma principalmente en su forma oxidada, y que el transportador es específico para la forma reducida, es necesario suponer la presencia de una o más proteínas con actividad reductasa de Cu en la membrana celular. En levaduras, se ha identificado una familia de reductasas de Cu, codificadas por los genes *Fre1* hasta *Fre7* (Labbe y cols, 1997, Martins y cols, 1998). En mamíferos estas proteínas no han sido claramente determinadas, sin embargo, recientemente se ha reportado la actividad reductasa de dos proteínas de la membrana celular, APP y PrP, previamente conocidas por su participación en las enfermedades de Alzheimer y de Creutzfeldt-Jakob respectivamente. Este hallazgo es de gran interés porque indica que perturbaciones en los mecanismos que regulan el metabolismo

celular de Cu pueden contribuir a generar diversas enfermedades neurodegenerativas ([Waggoner y cols, 1999](#)). Respecto a la participación de la proteína precursora del amiloide (APP) en el transporte de Cu, recientemente ha sido demostrado por [Suazo y González, 2002 \(comunicación personal\)](#) que células que sobre expresan el APP tienen una aumentada tasa de reducción de Cu observado por ensayos colorimétricos de reducción con Batocupreína, la cual se relaciona con una mayor incorporación de Cu, apoyando la idea de que esta proteína, puede ser una de las reductasas que regulan la entrada de Cu.

El transportador DMT1, es un transportador de metales divalentes, también llamado Nramp2 o DCT1. DMT1 es otra proteína que ha sido conservada estructural y funcionalmente desde bacterias hasta mamíferos. La mayor parte de los estudios sobre la función de esta proteína están relacionados con el transporte de Fe, dado que éste sería el principal transportador de Fe no unido a transferrina en mamíferos. Adicionalmente, se ha sugerido que DMT1 puede transportar otros metales divalentes como Cu, Zn, Mn, Co, Cd, Ni, Pb, ([Gunshin y cols, 1997](#)). En levaduras se ha propuesto que DMT1 estaría involucrado en el transporte de metales como Mn, para suplir a la proteína SOD mitocondrial ([Luk y Culotta, 2001](#)). La presencia de un transportador común para metales como Cu, Fe y Zn, sugiere el entrecruzamiento de sus rutas metabólicas. Sólo en los últimos años comienzan a aparecer en la literatura algunos reportes que exploran la relación metabólica entre estos metales traza, ejemplos de ello son: la influencia del contenido de Cu en células Caco2 sobre la absorción de Fe ([Han y Wessling-Resnick, 2002](#)),

cambios en el contenido y distribución de Cu y Zn en el hígado de un ratón tratado con una dosis única de Cd ([Yang y cols, 2000](#)) y la modulación en la absorción y transporte de Cu en células Caco2 expuestas a concentración iso- y sobre-fisiológicas de Zn ([Reeves y cols, 1996, 1998](#)).

### **Chaperonas**

La destinación intracelular de Cu a los sitios catalíticos de la metaloproteínas es un proceso fundamental para el normal metabolismo celular. Hace menos de una década que se han identificado proteínas, denominadas chaperonas, involucradas en la destinación del Cu intracelular en organismos tan diversos como bacterias, levaduras y mamíferos incluyendo al hombre ([Harrison y cols, 1999, Huffman y O'Halloran, 2001](#)). Estas proteínas presentan una alta afinidad por Cu y tienen una función dual que involucra la transferencia del metal y previenen la existencia de Cu libre intracelular. Esto ha sido elegantemente demostrado en estudios *in vivo* a través de la transferencia de Cu desde la chaperona Ccs1 hacia la SOD1. Por medio de la cuantificación de la abundancia de chaperona, del Cu intracelular y de la cantidad y actividad de la enzima en condiciones fisiológicas, se utilizó un modelo termodinámico para predecir que la concentración de Cu libre es menor a una molécula por célula ([Rae et al, 1999](#)). Esto significa que la activación de las metaloenzimas requiere de la destinación directa del metal mediante la interacción proteína-proteína y no el casual encuentro de átomos en su forma libre. Hasta ahora se han clonado las chaperonas para la SOD1, la CCO y el

transportador ATP7 (ver más adelante) en levaduras y sus equivalentes en mamíferos (ver revisiones: [Harrison y cols, 1999, 2000](#), [Huffman y O'Halloran, 2001](#)). La alta conservación a través de especies predice la existencia nuevas chaperonas para otras cuproenzimas celulares. En humanos, las chaperonas descritas son: HAH1 (8 kDa aprox, [Klomp y cols, 1997](#)), para el transportador de trans golgi ATP7 (ver mas adelante), Ccs1 (28 kDa aprox, [Culotta y cols, 1997](#)) para la SOD1 y Cox17 (8 kDa aprox, [Amaravadi y cols, 1997](#)) para la CCO ([Figura 1](#)). Todas ellas, junto con sus homólogas en murinos y en levaduras, comparten una estructura “open-faced  $\beta$ -sandwich” con un motivo de unión a metal altamente conservado MXCXXC (M: metionina, X: residuo variable, C: cisteína) con el que coordinan la unión de un átomo de  $\text{Cu}^{+1}$  (a excepción de Cox 17 que no tiene tal secuencia y une 2 átomos de Cu). ([Harrison y cols, 1999](#)). Se ha determinado por estudios de complementación, que estas proteínas suplen la función de sus proteínas homólogas en otras especies, pero no de otras chaperonas de la misma especie. Se sugiere que la especificidad en la interacción proteína-proteína estaría dada por los residuos cercanos al motivo de unión al metal a través de una interacción electrostática ([Harrison y cols, 1999](#)). El mecanismo de transferencia del Cu desde la chaperona hacia la metaloenzima esta en investigación actualmente. Se ha propuesto que la transferencia del metal ocurre a través del “docking” de la chaperona en la proteína receptora, lo que involucra interacciones electrostáticas, seguido por una disminución en la barrera de energía de

manera que hace posible la transferencia localizada del metal ([Huffman y O'Halloran, 2001](#), [Harrison y cols, 2000](#)). El estudio de las chaperonas de Cu es un campo emergente y todavía quedan más preguntas por resolver, como cuándo y cómo se cargan de Cu, y si su expresión es regulada por el metal. En relación con la primera pregunta, metalotioneínas podrían jugar un papel importante en la distribución del Cu intracelular.

## **GSH**

El glutatión (GSH) es un tripéptido que contiene grupos sulfidrilos que participan en la regulación del estado redox celular. Su síntesis es estimulada la exposición a Cu, y a través de sus residuos sulfidrilos une este metal y otros como Zn. Estudios realizados en células hepáticas en cultivo, sugieren que este tripéptido sería la primera molécula intracelular en unir el Cu entrante, y que en una segunda fase (luego de una hora de exposición) es la MT la principal receptora del Cu recién incorporado ([Freedman y cols, 1989](#)). No se ha establecido claramente si el papel en la detoxificación de Cu cumplido por GSH es a través de la quelación del metal o de la reconstitución del equilibrio redox desplazado por el exceso intracelular de Cu. Las evidencias sugieren que el papel de GSH en relación con la toxicidad de Cu es la reparación del daño celular producido por el metal. En este sentido, se ha reportado una disminución en el contenido de GSH en células expuestas a Cu, y los autores han propuesto que esta disminución ocurriría por la utilización del GSH por la GSH peroxidasa en su actividad reparadora de los lípidos peroxidados ([Stacey](#)

y Klaassen, 1981). En acuerdo a esta observación, en hepatocitos de ratas mantenidas en una dieta deficiente de Cu, se observó un mayor contenido de GSH comparado con hepatocitos de ratones mantenidos en dieta control (Chao y Allen, 1992). Sin embargo, otros investigadores han reportado que la generación de líneas celulares resistentes a Cu, tienen un elevado contenido del tripéptido, ya sea por un aumento en su síntesis o por una disminución en su eflujo (Freedman y cols, 1989). En relación con el metabolismo de Cu, a pesar de su abundancia intracelular, el impacto que puede tener GSH en la quelación del exceso del Cu intracelular se ve disminuido por su baja capacidad de unir Cu (2 moléculas de GSH unen un átomo de Cu, mientras que MT puede unir hasta 12) y por que la unión es débil, siendo desplazable por quelantes como BCS que no desplazan el Cu de chaperonas (Rae y cols, 1999).

### **Transportadores**

Parte del Cu citoplasmático es transportado por una bomba específica para Cu desde el citoplasma hacia el lumen de las vesículas de “trans golgi network” (Figura 1). Esta tras locación tiene, por una parte, la función de eliminar el exceso de Cu intracelular (Dameron & Harrison, 1998), y por otro lado, la de proveer de Cu a las metaloenzimas que se sintetizan en el complejo retículo endoplásmico-aparato de golgi como son ceruloplasmina, tirosinasa y lisil oxidasa entre otras (Terada y cols, 1995, Rucker y cols, 1998, Petris y cols, 2000). En forma alternativa, a través de esta bomba el exceso de Cu podría ser

retirado del citoplasma y almacenado en vesículas. Este transportador pertenece a la familia de las ATPasas de tipo P, proteínas conservadas evolutivamente desde bacterias hasta mamíferos. En mamíferos se han identificado 2 tipos de transportadores, denominados ATP7A ([Vulpe y cols, 1993](#)) y ATP7B ([Bull y cols, 1993](#), [Tanzi y cols, 1993](#)). El primero es un transportador de localización ubicua en los distintos tipos celulares a excepción del tejido hepático donde se expresa de manera restringida el transportador ATP7B ([Harris, 2000](#), [Suzuki y Gitlin, 1999](#)). Las diferencias en la función de estos transportadores esta bajo análisis en la actualidad. Se observó en estudios con fibroblastos inmortalizados de pacientes con la enfermedad de Menkes (ver más adelante) que la transfección con los genes de ambas proteínas restaura la función del transportador, ([La Fontaine y cols, 1998](#)). Al igual que CTR1, la función de estas proteínas parece tener un papel esencial. Esto se ve reflejado en la severidad de dos enfermedades genéticas humanas donde se anula la actividad de uno u otro transportador. En la enfermedad de Menkes (MD) se han detectado múltiples mutaciones en el gen ATP7A. Como consecuencia de ello, los pacientes con MD tienen una deficiencia sistémica generalizada de Cu y mueren durante los primeros meses de vida. A nivel celular, la falla en la función de este transportador significa que no hay una adecuada cantidad de Cu en el feto, por que hay una disminución en el paso del metal a través del cordón umbilical y a través del epitelio intestinal después de nacer. La falta de actividad de las cuproenzimas genera una perturbación generalizada de diversos procesos fisiológicos con múltiples consecuencias,

desde retraso mental, hasta problemas en la pigmentación y en la formación de huesos. La importancia en la función de estas ATPasas se ha demostrado tanto en células de mamífero como en levaduras a través de la restauración de la actividad de enzimas que requieren la traslocación del Cu a través de ellas (Petris y cols, 2000, Yuan y cols, 1995). En el otro extremo, se encuentra la enfermedad de Wilson (WD). En ella se ha detectado una mutación en el transportador ATP7B (Petrukhin y cols, 1994). El Cu es normalmente almacenado en el hígado desde donde es excretado a través del conducto biliar unido a aminoácidos o proteínas ligantes, o es secretado unido a Cp hacia la circulación portal y luego a la circulación sistémica. La deficiente o nula actividad de este transportador produce la sobre acumulación de Cu generando un daño hepático progresivo (fibrosis y luego a cirrosis), y posteriormente se afectan otros órganos sensibles a la exposición a Cu como son el sistema nervioso, riñón y córnea. Los estudios bioquímicos y moleculares realizados sobre la base de estas enfermedades han permitido en la última década reafirmar la importancia de mantener un control homeostático del contenido celular de Cu y avanzar significativamente en la caracterización de los elementos moleculares involucrados en éste proceso. En este sentido, el análisis de la regulación de la actividad y localización del transportador ATP7A por Cu ha tenido grandes avances en los años recientes. Por estudios principalmente de inmunofluorescencia, se localizó este transportador en la red trans del aparato de golgi (Nagano y cols, 1998, Yamaguchi y cols, 1996), lo que fue confirmado por el hallazgo de una secuencia señal de localización en

golgi en los dominios 3 y 4 del exón 10 del gen (Francis y cols, 1998). Posteriormente, por ensayos funcionales en células expuestas a altas concentraciones de Cu extracelular, se observó el reciclaje del transportador entre golgi y la membrana plasmática (Petris y cols, 1996). Este reciclaje también ocurre en condiciones basales, observándose que el estímulo de Cu aumenta el número de transportadores en la membrana mediante el incremento del movimiento exocítico del transportador sin afectar su endocitosis (Petris y Mercer, 1999). Esta característica, establece diferencias funcionales entre los transportadores, dado que ATP7B parece no tener la capacidad de reciclar con la membrana plasmática cuando es transfectado en fibroblastos inmortalizados de pacientes con MD (La Fontaine y cols, 1998), pero sí cuando es expresado en células hepáticas (Nagano y cols, 1998). El mecanismo por el cual ATP7A recicla entre la membrana, un compartimiento endosomal y el aparato de golgi no se ha establecido claramente. Se ha demostrado que de los 6 sitios de unión a Cu (GMXCXXC) localizados en su extremo amino terminal, los sitios 5 y 6 serían necesarios y suficientes para su relocalización (Strausak y cols, 1999). Específicamente, dos leucinas contiguas (L1487L1488) serían la señal de internalización mediante endocitosis (Francis y cols, 1999) que lo retiene en golgi (Petris y cols, 1998). Este transportador y las MT podrían ser las principales moléculas responsables de la defensa contra el exceso Cu. Esta proposición proviene de la observación de que ATP7A responde fuertemente a la exposición a Cu, al igual que MT. En células CHO expuestas a Cu se ha relacionado la amplificación del gen de ATP7A con la

menor sensibilidad a la toxicidad por Cu ([Camakaris y cols, 1995](#)). La misma observación fue realizada en hepatocitos, donde se identificó la actividad el transportador ATP7B, como responsable de la resistencia a Cu en células que no expresan MT ([Schilsky y cols, 1998](#)). Más aún, se ha observado que en ausencia de MT y ATP7A se desarrolla un fenotipo no viable, aún en condiciones normales de exposición al Cu. Esto se determinó mediante la cruce de ratones hembras heterocigotos para los genes de ATP7A (este gen esta ligado al cromosoma X) y MT con ratones machos MT nulos. Realizando análisis genético de los embriones de día 11 de gestación, se identificaron ratones 1) homocigotos nulos para ambos genes, 2) nulos para MT y heterocigotos para ATP7A y 3) heterocigotos para MT y nulos para ATP7A. Con ellos se generaron líneas inmortalizadas de fibroblastos, los cuales fueron expuestos a concentraciones crecientes de Cu observándose que los fibroblastos doble mutantes mueren a concentraciones sub-fisiológicas de Cu ([Kelly y Palmiter, 1996](#)). Dos de las líneas utilizadas en esta tesis provienen de este estudio, y han sido generosamente provistas por el Dr. Palmiter. La línea 805 corresponde a fibroblastos heterocigotos para MT y la línea 804 a fibroblastos homocigotos nulo para MT (ambas son silvestres para el transportador).

## METALOTIONEINA

### Estructura

Metalotioneínas son proteínas ubicuas con características fisicoquímicas que las hacen particulares. Todas ellas son de bajo peso molecular (6-7 kDa) inusualmente ricas en cisteínas (20-30%), carentes de residuos aromáticos e hidrofóbicos y capaces de unir múltiples átomos de metales pesados (Hamer, 1986). Ellas fueron descritas inicialmente en 1957 por Margoshes y Vallee como una proteína que une Cd en el riñón de caballo. Desde entonces, se han descrito MTs en una amplia diversidad de especies que incluye algunas bacterias y todos los eucariontes analizados (levaduras, plantas, invertebrados, insectos, moluscos, peces y mamíferos) (Hamer, 1986). En mamíferos, se expresan varias isoformas de la proteína, todas ellas tienen entre 60 a 68 aa, 20 de los cuales son cisteínas en secuencias Cis-Cis y Cis-X-Cis. La estructura tridimensional de MT se ha analizado por NMR, cristalografía y espectroscopía de rayos X en diferentes especies, encontrándose un alto grado de similitud en su estructura espacial (Kagi y Kojima, 1987, Furey y cols 1986). Todas ellas tienen una forma de campana con dos dominios que contienen “clusters” metálicos, constituidos por varias unidades tetrahédricas del metal. Esta coordinación ocurre exclusivamente por las cisteínas a través de sus grupos sulfidrilos y todas ellas están utilizadas en la unión de metales. MTs no presentan estructura secundaria conocida. Fisiológicamente, MT puede unir 7 átomos de Zn y hasta 12 átomos de Cu. MT puede unir más de un tipo de metal en la misma molécula, encontrándose especies mixtas como Cu-Zn-MT

(Munger y cols, 1985) Cd-Zn-MT (Li y Otvos, 1996). Además, se ha observado que la apo-MT puede unir 7 átomos de Cd, Hg, Co, Ni, Pb y 10 a 12 átomos de Ag y Au. La afinidad de la unión a metales varía dependiendo del ión, observándose las constantes de estabilidad de  $10^{19}$  a  $10^{17}$ ,  $10^{17}$  a  $10^{15}$  y  $10^{14}$  a  $10^{11}$  para Cu, Cd y Zn respectivamente, de manera que el Cu desplaza al Zn de la Zn-MT (Hamer, 1986, Shaw y cols, 1991).

### **Secuencia y Expresión Génica**

Aunque las MTs se expresan en todos los tejidos, su expresión es más abundante en tejidos de origen parenquimal como son hígado, riñón, páncreas e intestino. Su nivel de expresión va a estar dado finalmente por factores como, estado del desarrollo, edad, dieta y probablemente otros factores aún no se han identificado. MT es principalmente una proteína citoplasmática, pero también ha sido identificada en núcleo y lisosomas (Nagano y cols, 2000, Cherian y Apostolova, 2000, Klein y cols, 2000).

En todos los vertebrados los genes de MT están constituidos por una región 5' flanqueadora (5'UT), una región no traducida (5'UTR), 3 exones separados por dos intrones y una región 3' flanqueadora. La región 5' no traducida contiene elementos reguladores en posición *cis* entre los cuales hay una o más copias de elementos que responden a metales (MRE) (Stuart y cols, 1985). MRE es el sitio de unión del factor de transcripción MTF-1. Este factor de transcripción es altamente conservado y su estructura presenta seis "dedos de Zn" en el sitio de unión a DNA (Brugnera y cols, 1994). Existen evidencias

de que este mismo factor de transcripción podría mediar la inducción de MT estimulada por estrés oxidativo (Dalton y cols, 1996 b). Heuchel y cols (1994) anularon mediante recombinación homóloga la expresión de MTF-1 en células de embrión de ratón (“stem cells”), y observaron que, además de la ausencia de la expresión de esta proteína, anularon la expresión basal e inducida por Zn de MT. Este resultado sugiere que la actividad de este factor de transcripción es esencial para la expresión de MT. Mas aún, este mismo grupo de investigadores mas tarde observó que la falta de expresión de MTF-1, impide el desarrollo de embriones de ratón más allá de los 14 días de gestación, demostrando que la actividad de este factor de transcripción es esencial. Estos embriones también fallan en la expresión de MT I/II y en la expresión de una enzima involucrada en la síntesis de glutatión, por lo que los autores sugieren que MTF-1 esta involucrado en la homeostasis de metales y en la regulación del estado redox de la célula, especialmente durante el desarrollo del hígado (Gunes y cols, 1998).

En eucariontes, los genes que codifican para MTs usualmente están representados en varias copias. Tanto en humanos como en murinos las múltiples copias de genes de MT se encuentran agrupados en un solo cromosoma. En humanos se han identificado 16 genes de MT en el cromosoma 16, pero solo 4 de ellos son funcionales: MT IA, IE, IF, y IIA (West y cols, 1990, Karin y cols, 1984). Mientras que en ratones se han clonado 4 genes agrupados en un segmento de 50 kb en el cromosoma 8 (MT I, II, III y IV), siendo todos ellos funcionales (Yamada y cols, 1994, Schmidt y cols,

1984). MT I y II (MT I/II) son expresadas en todos los estados del desarrollo en varios tipos de células de la mayoría de los órganos. MT III es expresada predominantemente en neuronas pero también en las glías y en ciertas células de diversos órganos del aparato reproductivo masculino (Masters y cols, 1994, Uchida y cols, 1991, Moffatt y Seguin, 1998). MT IV es expresado particularmente en las células del epitelio escamoso estratificado diferenciadas (Quaife y cols, 1994). No es claro si estas isoformas tienen funciones redundantes o divergentes. La característica biológica más conspicua de las MTs es su inductibilidad por una variedad de agentes y condiciones. Entre ellos están algunos metales (Cu y Zn son los inductores fisiológicos y Cd el principal inductor no fisiológico) (Hidalgo y cols, 1978, Suzuki y Yamamura, 1980, Bremner y Davies, 1975), glucocorticoides (Karin y Herschman, 1980) e interferones (Friedman y cols, 1984), agentes alquilantes y varios tipos de estrés (Oh y cols, 1978). Se ha observado, en cultivos celulares expuestos a metales, que el aumento en la expresión de MT también ocurre por amplificación génica. Se observó una amplificación de más de 6 veces del gen de MT durante el proceso de selección de células resistentes a Cd (Beach y Palmiter, 1981).

### **Funciones Propuestas en el Metabolismo de Metales**

Las funciones propuestas para MT se pueden clasificar en:

a) Almacenamiento de Cu y Zn. Su papel en el almacenamiento de metales esta apoyado fuertemente por el aumento de su contenido durante el desarrollo en mamíferos. Durante la última fase del desarrollo fetal en ratas se ha

reportado un considerable aumento en el contenido de MT, el cual es concomitante con un aumento en el contenido de metales, especialmente de Zn (Panemangalore y cols 1983). Aunque con variaciones en las etapas del desarrollo fetal, este incremento de MT y metales ha sido observado en otros mamíferos como ovejas (Paynter y cols, 1990) y humanos (Cherian, 1994). Más aún, se ha reportado una disminución simultánea en el contenido de Zn y MT en el hígado de estos animales en el período postnatal. Esto ha sido atribuido al crecimiento del hígado y/o a la alta demanda en la síntesis de proteínas, entre ellas metaloproteínas, que caracteriza al rápido crecimiento de los mamíferos en esta etapa. Quaife y cols, (1986) han propuesto que la expresión de MT en el hígado fetal estaría mediada por la inducción de glucocorticoides, y que ésta llevaría al consecuente aumento en el contenido de metales. Ratones mutantes nulos para MT I/II tienen un menor contenido de Zn en el hígado al nacer (Coyle y cols, 1995, Philcox y cols, 1995) y ratones mutantes que sobre expresan MT I/II tienen un mayor contenido de Zn en diversos órganos (Davis y cols, 1998, Lau y Cherian, 1998). Interesantemente, ratones que sobre expresan MT son más resistentes a dietas deficientes de Cu (Susuki y cols, 2002) y Zn (Dalton y cols, 1996).

b) Rol en el metabolismo de Cu y Zn. MT puede servir como una chaperona para la síntesis de metaloproteínas. MT puede ser un reservorio para metales, evitando la toxicidad y además donando metales a las apo-metaloproteínas. La transferencia de metales desde MT hacia apo-proteínas ha sido demostrado *in vitro* (Udom y Brady, 1980, Cano-Gouchi y Sarkar, 1996, Maret y cols, 1997,

Jacob y cols, 1998) y a su vez, que GSH puede ser un facilitador en este proceso (Maret, 1994, Jiang y cols, 1998 Jacob y cols 1998, Maret y cols 1999). Maret y Vallee (1998) demostraron que la organización de las cisteínas que unen Zn en MT generan un ambiente redox particular, de manera que agentes oxidantes suaves, como grupos disulfuros, pueden liberar iones de Zn. La idea propuesta por estos investigadores, es que a través de cambios locales en el estado redox de la MT, y de la presencia de quelantes biológicos como GSH, ésta puede aceptar o ceder iones en un proceso controlado y no azaroso determinando finalmente la distribución del metal. Evidencias *in vitro* señalan que no todos los átomos de Zn unidos a MT son transferibles, siendo al menos 1 de ellos más susceptible a ser removido (Jacob y cols 1998, Jiang y cols 1998). Así mismo, experimentos *in vitro* muestran que Cu-MT puede restaurar la actividad de apoSOD1 (Liu et al, 2000) sugiriendo fuertemente que esta puede ser una propiedad fisiológica, de manera que MT sería un modulador del metabolismo de Cu y Zn. Más aún, el intercambio de átomos de Zn con proteínas con dedos de Zn hacen de la MT un modulador de la expresión génica.

c) Detoxificación de Cd. Su papel en la detoxificación de Cd proviene de la observación de que mutaciones que previenen la síntesis de MT generan sensibilidad a Cd mientras que un exceso en la expresión de MT confiere resistencia a la toxicidad por este metal (Hamer, 1986, Klaassen y Liu, 1998) Sin embargo, algunos investigadores discuten que éste sea su rol evolutivo. Los casos de intoxicación por Cd son escasos y siempre son causados por el

hombre. Esto sugiere que la detoxificación es más bien un resultado de su propiedad de unión a metales y no de su función evolutiva. El fuerte impacto que parece tener Cd en relación a la función de MT puede ser explicado por la ausencia de otros mecanismos biológicos que defiendan al organismo de su toxicidad, como la presencia de transportadores específicos cuya función pueda ser regulada en orden de mantener su homeostasis (Bremer y Beattie 1990, Palmiter, 1998).

Dado el alto grado de conservación en las MTs y sus particulares características fisicoquímicas, se postuló que MTs tendrían un rol esencial en el normal desarrollo de los organismos. Esta afirmación se ha visto cuestionada luego de la generación de una cepa de ratones mutantes nulos para las MT I y II. Dos diferentes grupos de investigadores crearon una cepa de ratones en la que fue anulada la expresión de las isoformas más abundantes de MT (Michalska y Choo, 1993; Masters y cols, 1994 b). Los ratones mostraron ser viables y saludables en las condiciones normales de mantenimiento en vivero, sugiriendo que la presencia de MT no es necesaria para suplir de Cu a las chaperonas y en consecuencia a las metaloenzimas. Sin embargo, estos animales son más sensibles a la exposición a elementos tóxicos como Cd (Liu y cols 2000), agentes mutagénicos (Davies y cols 2001) y generadores de estrés oxidativo (Kawai y cols 2000). Además, existen evidencias de que ratones mutantes nulos para MT I/II son más sensibles a dietas deficientes a Cu y Zn comparado con ratones silvestres bajo la misma restricción dietaria

([Suzuki y cols 2002](#)). Estos resultados sugieren que probablemente la función de MT es redundante en condiciones normales de crecimiento, y que se puede observar su esencialidad sólo en condiciones extremas de exposición a metales.

La esencialidad y la redundancia en su función se observó con la generación de ratones dobles mutantes para expresión de MT y del transportador ATP7A ([Kelly y Palmiter, 1996](#)). Los ratones mutantes nulos para ATP7A mueren a las 2 semanas de vida, pero pueden sobrevivir con la administración de Cu desde el nacimiento. La doble mutación no fue viable, observándose una clara disminución en el número de fetos a los 11 días de gestación (3% respecto al control) y la ausencia de animales doble mutantes a los 9 días post-nacimiento. Este resultado sugiere que la actividad conjunta de MT y de ATP7A es suficiente y necesaria para el control homeostático del Cu celular. Interesantemente, en células hepáticas seleccionadas por la resistencia a Cu en ausencia de la inducción de MT, se identificó como un factor de resistencia a la amplificación del transportador ATP7B ([Schilsky y cols 1998](#)). De esta manera, estos resultados sugieren una fuerte conexión funcional entre estas dos proteínas que pueden ser las principales responsables de la mantención de la homeostasis celular de Cu.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Dado que el Cu es esencial para el desarrollo de un amplio número de organismos, pero que al mismo tiempo puede ser tóxico, es necesaria la presencia de mecanismos de homeostasis precisos. Los elementos moleculares involucrados en este control son diversos, relacionados tanto con la entrada, almacenamiento (cantidad y localización) y la salida del metal de la célula. Las MTs, como proteínas citoplasmáticas con propiedades fisicoquímicas particulares juegan un rol importante. Ellas unen múltiples átomos de Cu con alta afinidad pero con la labilidad cinética necesaria para la transferencia de algunos de ellos a otras metaloproteínas. Por otro lado, existe una amplia correlación entre la presencia de estas proteínas y un aumento en la resistencia frente a la toxicidad generada por la exposición a Cu. Dado que el mecanismo por el cual MT protege a las células no ha sido establecido se propone como hipótesis para esta tesis doctoral que: **“La MT es responsable de la resistencia celular al incremento del contenido de Cu mediante el secuestro del exceso de Cu intracelular”**. En el marco de esta hipótesis, se proponen como objetivos generales:

- 1) Estudiar la función de MT en la regulación de la viabilidad celular y el contenido y localización del Cu intracelular.

- 2) Estudiar la regulación de MT en los procesos de incorporación y excreción de Cu hacia y desde la célula respectivamente.

Se propone como estrategia experimental el análisis comparativo de los fenómenos celulares relacionados con la regulación del contenido de Cu en 2 líneas celulares de fibroblastos de embriones de ratón que provienen de la misma camada, siendo su principal diferencia que una es silvestre y la otra es mutante nula para la expresión de MT. Ambas líneas serán expuestas a concentraciones crecientes de Cu extracelular para desarrollar los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la viabilidad celular en fibroblastos mutantes y silvestres
- Determinar el contenido celular de Cu y de MT en fibroblastos mutantes y silvestres
- Analizar la incorporación de Cu en fibroblastos mutantes y silvestres
- Analizar la excreción de Cu en fibroblastos en fibroblastos mutantes y silvestres
- Determinar la distribución subcelular de Cu en fibroblastos mutantes y silvestres
- Analizar la expresión de genes relacionados con el metabolismo de Cu en fibroblastos mutantes y silvestres.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

#### 2.1.1. CÉLULAS EUCARIÓTICAS.

Las células utilizadas en esta tesis provienen de líneas inmortalizadas y son las siguientes:

Las líneas 804 y 805 fueron donadas por el Dr. J. D. Gitlin (Washington University, St. Louis, USA). Ambas líneas fueron creadas por el grupo del Dr. Palmiter (University of Washington, Seattle, USA) y corresponden a fibroblastos de embriones de ratón provenientes de la cruce de una hembra heterocigoto para los genes que expresan MT I y II y para el gen del transportador ATP7A con un ratón macho homocigoto nulo para la expresión de los genes de MT I y II. De esta manera, mediante la genotipificación de los embriones se establecieron entre otras, las líneas celulares 804 y 805 cuya principal diferencia es la ausencia y presencia respectivamente de MT I y II (estas dos líneas expresan normalmente el ATP7A) ([Kelly y Palmiter, 1996](#)). La cepa de los ratones mutantes que no expresan los genes de MT I y II utilizada en la cruce anterior, fue creada por el mismo grupo del Dr. Palmiter. La mutación fue generada a través de la inserción de secuencias de detención de la traducción en ambos genes contenidos en un plasmidio, mediante la técnica de recombinación homóloga ([Masters y cols, 1994](#)).

Las líneas HepG2, Caco2, y HeLa son líneas celulares humanas, provenientes de hepatoblastoma, células tumorales con características de enterocito y adenocarcinoma de cervix respectivamente.

Las líneas N2a y NIH 3T3 son de ratón y provienen de un neuroblastoma y de fibroblastos de embriones respectivamente.

La línea B12 y NRK corresponden a células de glioblastoma y de epitelio de riñón de rata respectivamente.

#### 2.1.2 BACTERIAS.

Las bacterias utilizadas para la amplificación de secuencias génicas de interés fueron *E. coli* de las cepas DH5 $\alpha$  y JM109 (Promega, WI, USA).

#### 2.1.3 PLASMIDIOS.

Se utilizaron 3 tipos de plasmidios distintos y corresponden a:

- a) pCR 2.1 fue obtenido de Invitrogen, CA, USA. Contiene el promotor de células procariontes T7 y resistencia a ampicilina y kanamicina.
- b) pcDNA 3.1(+) fue obtenido de Invitrogen, CA, USA. Contiene el promotor de células eucariontes CMV, resistencia a ampicilina y neomicina.
- c) pGEM-T fue obtenido de Promega, WI, USA. Contiene el promotor de células procariontes T7 y SP6, y tiene resistencia a ampicilina.

#### 2.1.4 PARTIDORES

Para la amplificación y clonamiento de los genes que codifican para proteínas que participan en el metabolismo celular de Cu y para proteínas de expresión constitutiva, se utilizaron los siguientes partidores:

Para MT:

La Metalotioneina I, se obtuvo el siguiente par de partidores, diseñados anteriormente por el Dr. M. González. Sus secuencias están en dirección 5'- 3' y fueron sintetizados comercialmente por Applied Biosystems, CA, USA:

Mouse MT#2-5': GGA ATG GAC CCC AAC TGC TCC TG

Mouse MT#2-3': ATA CTA TTT ACA CGT GGT GGC AGC GCT GTT

Los partidores de los siguientes genes fueron diseñados en nuestro laboratorio utilizando el programa Primer Premier, versión 5.0 y sintetizados por BiosChile, Santiago, Chile. Las secuencias sentido (S) y antisentido (A) se expresan desde el extremo 5':

**SOD1 (de baja homología)**

S: TGACTGCTGGAAAGGACG

A: AGTTTAATGGTTTGAGGGTA

**ATP7A (de alta y baja homología respectivamente)**

S: TGAAGCCACTATTGTAACTC CAGGCTGTGGTATTAGCT

A: AGGTTTCTTAGCCACAGG AGTCCGACCTCTTCTTTC

**ATP7B (de alta y baja homología respectivamente)**

S: CGCAGATGCTGTCAAACC GCGACTTTCTTCCCTTCA

A: GGAGACCTTGGGATACAG

CTGTCCTTTCATCTCGTG

### **MT (de baja homología)**

S: CCGTGGGCTGCTCAAAT

A: TAGGAAGACGCTGGGTTG

### **Tubulina**

S: CATTGCCACCATCAAGACCA

A: TCAACGCCAACCTCCTCATA

### **GDPH (o G3P)**

S: ACCACAGTCCATGCCATCAC

A: TCCACCACCCTGTTGCTGTA

### **Ccs (de baja homología)**

S: TCCCTTATCCAAGATCACAG

A: CGAGGACCAAATAACCTGA

### **Atox 1**

S: CTCAACAAGCTGGGAGGAGTG

A: GCTTCCATGTAATAAAGTCAAGC

### **APP**

S: ATGCTGCCCGGTTTGGCAC

A: AGCCTCTGAAGTTGGACAG

### **Prpc**

S: TGTTCCCTTCGCATTCTCG

A: TGTTAGCACTGGCTGATG

## D-Rap

S: AAGCAGGTGGAGGTGGACG

A: TCGGGCGACTTCTTGTTGA

### 2.1.5 ANTICUERPOS.

- 1) Anti Metalotioneína. El anticuerpo monoclonal producido contra Metalotioneínas I y II de caballo fue obtenido de la empresa Dako, CA, USA.
- 2) Anti ATP7A. Este anticuerpo policlonal producido en oveja fue generosamente donado por el Dr. Mercer.
- 3) Anti Actina. Este anticuerpo fue producido en conejo por Cytoskeleton, CO, USA.
- 4) Anti Faloidina conjugado a rodamina. Obtenido de Molecular Probes
- 5) Anti N-Caderina. Este anticuerpo monoclonal fue producido por Sigma, CO, USA.
- 6) Anti IgG de ratón conjugado a Fosfatasa alcalina fue producido en cabra y obtenido de Calbiochem, CA, USA.
- 7) Anti IgG de cabra conjugado a Peroxidasa producido en Sigma, USA
- 8) Anti IgG de cabra conjugado a fluoresceína fue adquirido de Sigma, USA
- 9) Anti IgG de conejo conjugado a Peroxidasa fue producido por Sigma, USA.

## 2.2.- REACTIVOS

### 2.2.1. MEDIOS Y SUPLEMENTOS DE CULTIVO.

a) Para el cultivo de células de mamíferos se utilizó el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino (SFB) y los antibióticos Penicilina y Estreptomina. El DMEM utilizado provino en forma líquida para mantener el mismo contenido de metales en el agua entre botellas. Todos los reactivos anteriores fueron obtenidos de la empresa Gibco, BRL, USA.

b) Para el cultivo de bacterias se obtuvo agar-agar de Difco, MI, USA. De Hi-Media, Bombay, India se obtuvieron extracto de levadura y triptona. Los antibióticos ampicilina y kanamicina fueron obtenidos de Gibco, BRL, USA.

### 2.2.2. ENZIMAS.

Las enzimas de restricción utilizadas se obtuvieron de las empresas: New England BioLabs, MA, USA, Gibco, BRL, USA, Promega, WI, USA y Fermentas, MD, USA.

La Taq DNA polimerasa (incluyendo el tampón de PCR 10x y  $MgCl_2$  50mM) y la T4 DNA ligasa se obtuvieron de Gibco BRL.

La tripsina-EDTA se obtuvo de Gibco BRL.

### 2.2.3 MARCADORES DE PESO MOLECULAR.

a) Para geles de DNA se utilizaron marcadores de 1 kb DNA Ladder obtenidos de Promega, WI, USA.

b) Para geles de poliacrilamida-SDS se utilizaron los estándares preteñidos de amplio y bajo rango provenientes de Gibco, BRL.

#### 2.2.4 MATERIAL RADIOACTIVO.

El  $^{64}\text{CuSO}_4$  se obtuvo de la Comisión Chilena de Energía Nuclear, Santiago, Chile.

#### 2.2.5 REACTIVOS GENERALES.

De SIGMA: Metalotioneína de hígado de conejo, MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Tween 20, Tritón X-100, y SDS, hidróxido de sodio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, EDTA, glicerol, paraformaldehído, formaldehído, Tris, albúmina de suero bovino (BSA), GSH, agarosa, agarosa LMP, película Kodak X-Omat,  $\beta$ -mercaptoetanol, azul de bromofenol, azul brillante de Coomassie R-250 y Rojo Ponceau S, Hepes,

De Pharmacia: ECL.

De MERCK: Ac. Nítrico, Ac. Metafosfórico, Ac. Clorhídrico, Ac. Acético, Etanol, Metanol, Isopropanol, Cloroformo, Alcohol isoamílico, Formamida, Ac. Bórico.

De Calbiochem: Kit GSH.

De Fermelo: Ecoscint H.

De Gibco BRL: TRIZOL, dNTPs, Azul de Tripán, PBS, Lipofectamina PLUS, Bromuro de Etidio.

De NEN Life Science: CDP –Star Chemiluminescence reagent.

De Promega: Kit LDH Cytotox 96, Wizard Plus Mini y Midi Preps,

De WINKLER LTDA: Acrilamida/bisacrilamida 29:1, Persulfato de amonio, Temed, Fenol.

De Bio-Rad: Membranas PDVF,

De NalgeNunc, NY, USA: todo el material plástico de cultivo: placas de 96, 48, 24, 12 y 6 pocillos. Placas de 96, 60 y 35 mm. Frascos de 75 y 25 cm<sup>2</sup>.

## 2.3 MÉTODOS

### 2.3.1. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO.

#### MANTENCIÓN DE LAS CÉLULAS

Todas las líneas celulares utilizadas en esta tesis fueron mantenidas en similares condiciones en un incubador a temperatura (37° C) y presión de CO<sub>2</sub> (5 %) constantes. Las células fueron crecidas en frascos T75 o placas de 96 mm en un medio DMEM suplementado con 10% de SFB y los antibióticos Penicilina (100 UI/ml) y Estreptomina (100 µg/ml) ([Kelly y Palmiter, 1996](#), [González y cols, 1999](#) y [Tapia y cols, 2002](#)). El medio de cultivo fue cambiado cada 2-3 días. Para almacenar las líneas celulares, alícuotas de

aproximadamente  $2 \times 10^6$  células fueron congeladas en DMEM 10% SFB 10% DMSO en criotubos de 1,8 ml en N<sub>2</sub> líquido.

## RECUPERACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

La recuperación de las células se realizó mediante un tratamiento suave con Tripsina-EDTA. Inicialmente las células fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS), y se incubaron en 0.01% Tripsina-EDTA a 37° C por 5 min. La digestión se detuvo con la adición de medio DMEM-SFB y el medio con las células fue centrifugado a 3000 rpm por 5 min. Para la mantención (subcultivo) de la línea, la pella fue resuspendida en medio de cultivo fresco y sembrada nuevamente en placas de cultivo generalmente en la razón 1:3. Para la utilización de las células en ensayos bioquímicos, la pella fue lavada una vez con PBS y utilizada directamente o congelada a -20 °C para su almacenamiento.

### 2.3.2. WESTERN BLOT

#### Extracción De Proteínas

La preparación de extractos de proteínas enriquecidos en MT fue realizada como se describe en [Sone y cols, 1987](#) con modificaciones descritas por [Mizzen y cols, 1996](#). Pellas de aproximadamente 5 millones de células fueron resuspendidas en 200 µl de tampón de extracción (NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub>

3 mM, Nonidet P-40 0.5% y Tris HCl 10 mM pH 7.0) y homogenizadas utilizando jeringas de 20 gauges. El homogenizado fue agitado y mantenido en hielo por 5 min. Las muestras se centrifugaron a 12000 x g por 15 min a 4° y el sobrenadante generado fue calentado a baño maría por 5 min a 95 °C y centrifugado nuevamente. El sobrenadante obtenido fue liofilizado y resuspendido en 30 µl de agua, del cual se tomaron 5 µl para cuantificar proteínas.

Para el análisis de la expresión de la proteína ATP7A y actina, se prepararon extractos a partir de  $8 \times 10^6$  células. La pella de estas células fue resuspendida en 2 volúmenes de Tris 0,1 M pH 6,8 SDS 2% en hielo. Las muestras fueron homogenizadas mecánicamente con la ayuda de jeringas de 20 gauges. Se determinó la concentración de proteínas y se utilizaron alícuotas de 30 µg para el ensayo de western blot.

#### Carboximetilación (sólo para las muestras de MT)

Se tomaron 20 µg de cada muestra las que fueron llevadas a un volumen final de 5 µl en agua. Se incluyó en las muestras una alícuota de MT comercial como control. La carboximetilación se realizó como se describe en [Sone y cols, 1987](#). Se les adicionaron a cada muestra 1.2 µl de DTT 0,05 M y éstas fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente. Luego se les adicionaron 0.7 µl de iodoacetamida 1M fresca resuspendida en Etanol por otra hora a temperatura ambiente. Terminada la incubación se les agregó 3 µl de tampón de carga 4x (Tris-HCl 0,125 M, pH: 6,8, SDS 6%, glicerol 20%, β-

mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0,07%). La solución fue hervida por 5 min y enfriada en hielo.

#### Electroforésis En Geles De Poliacrilamida-SDS.

La electroforésis se realizó según el protocolo convencional descrito por [Laemmli, 1970](#). Diez  $\mu\text{g}$  de cada muestra problema y aproximadamente 0.2-0.5  $\mu\text{g}$  de la muestra control (MT pura) fueron cargadas por carril en geles de poliacrilamida-SDS al 15%. Para la detección de Menkes y actina se utilizaron 30-50  $\mu\text{g}$  de los respectivos extractos celulares. Para todos los casos, se utilizó una cámara vertical de electroforésis para geles de 11 x 8,5 x 0,15 cm. Los geles se corrieron a voltajes constantes de 70 V para el gel concentrador y 150 V para el gel separador hasta observar la caída del frente de azul de bromofenol.

#### Transferencia

Luego de la electroforésis, los geles fueron equilibrados en el tampón CAPS (10 mM pH 11, 15% metanol) el que, para la transferencia de las muestras de MT fue suplementado con 2 mM de  $\text{CaCl}_2$ , por 20 min a temperatura ambiente como se describe en [Mizzen y cols, 1996](#). También se equilibraron en este tampón las membranas de PDVF luego de ser activadas por 30 segundos en metanol puro. La transferencia se realizó en cámara de inmersión completa a 60 V por 1 hr. La calidad de la transferencia se evaluó por la tinción de la membrana con Rojo Ponceau (0.1% p/v Ponceau S en 5%

v/v de ác. acético) y del gel transferido con Azul de Coomasie (0.1% de azul, 40% metanol y 10% de ác. acético).

### Revelado De La Reacción Antígeno-Anticuerpo

Otra importante modificación al protocolo de transferencia estándar para la detección de MT es el tratamiento de la membrana con Glutaraldehído (Mizzen y cols, 1996). Las membranas transferidas se incubaron con una solución de 2.5% de Glutaraldehído por 1 hr a temperatura ambiente. Luego de la incubación, éstas fueron lavadas 3 veces por 5 min con tampón fosfato (8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl pH 7,4) en agitación y en el cuarto lavado se le adicionó monoetanolamina 50 mM. Las membranas con los extractos de proteínas que se utilizaron para la detección de ATP7A y actina, fueron tratadas igual que las de MT en el protocolo que sigue: el bloqueo se realizó con BSA 3% en tampón TST (Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%) a temperatura ambiente por 1 h. Luego fueron lavadas 3 veces con TST e incubadas por 1 h con el anticuerpo monoclonal anti MT a una dilución de 1:500, anti-ATP7A 1:250, anti-actina, 1:500 en TST 1% BSA. Al finalizar la incubación, las membranas fueron lavadas nuevamente e incubadas con el segundo anticuerpo; anti-mouse conjugado a fosfatasa alcalina 1:1000, anti-goat conjugado con peroxidasa 1:4000 y anti-rabbit conjugado a peroxidasa 1:1000 respectivamente, por 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados nuevamente y el cuarto lavado se realizó en tampón fosfato. El

revelado de la reacción antígeno anticuerpo se realizó incubando la membrana con un sustrato para la enzima fosfatasa alcalina cuyo producto es quimioluminiscente (CDP) de manera que la presencia de la MT fue observada en films radiográficos. En los casos en que se utilizó un segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa, se utilizó el kit ECL para revelar la reacción antígeno-anticuerpo.

### 2.3.3. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Células 805 y 804 fueron sembradas en cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro en esterilidad. Cuando las células llegaron a un 80% de confluencia fueron fijadas y permeabilizadas en metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Ellos fueron incubados con los anticuerpos: anti-MT (1:100), anti-ATP7A (1:250), faloidina (1:400) y anti-N-caderina (1:100). Luego fueron lavados e incubados con segundos anticuerpos acoplados a fluoresceína o rodamina en diluciones variables (1:100 a 1:1000). La marcación fluorescente fue observada por microscopía convencional. Adicionalmente para el reconocimiento del transportador ATP7A, algunos fibroblastos fueron fijados en paraformaldehído 0.4 % antes del tratamiento con anticuerpos.

### 2.3.4. EXPOSICIÓN DE LÍNEAS CELULARES A Cu.

Las células fueron expuestas a concentraciones variables de Cu extracelular (0,1 a 500  $\mu\text{M}$ ) por distintos periodos de tiempo dependiendo del tipo de ensayo realizado. El Cu (tanto el frío como el  $^{64}\text{Cu}$ ) fue adicionado a las

células acomplejado a histidina en la razón 1:10 y disuelto en medio de cultivo antes de agregarlo a las células (McArdle y cols, 1988, Mas y Sarkar, 1992). Al finalizar el tiempo de exposición, las células fueron lavadas con PBS frío y con PBS/Cu-His para el caso de exposiciones a Cu radiactivo. El contenido de Cu total se cuantificó por TXRF y AAS, y el de Cu radiactivo en un contador de centelleo (ver protocolos más adelante).

### 2.3.5. CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.

El análisis de viabilidad celular se realizó en células expuestas a concentraciones variables de Cu extracelular (10-250  $\mu$ M Cu-His) en placas de 24 pocillos. Las células fueron sembradas en cantidades tales que al finalizar el tratamiento aún estuvieran sub-confluentes.

#### Ensayo DE MTT

La viabilidad se evaluó a través de la cuantificación de un marcador de actividad mitocondrial; MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Kelly y Palmiter, 1996). Luego de la exposición a Cu, las células fueron incubadas en medio de cultivo nuevo conteniendo MTT 0.5 mg/ml por 1 h a 37°C, luego se solubilizaron en Isopropanol 70%/ HCl 0.04 N y se cuantificó la producción de formazán registrando la diferencia en la absorción a 630 nm y a 570 nm. Los valores de viabilidad obtenidos en el ensayo se expresaron en porcentaje respecto a los valores obtenidos en las células control.

### Cuantificación Por Azul Tripán

Se analizó la viabilidad celular en cultivos expuestos a Cu con el método de exclusión de azul tripán. Las células luego del tratamiento fueron recuperadas mediante una tripsinización suave y resuspendidas en Azul tripán a una dilución conocida. Una alícuota de cada muestra fue contabilizada utilizando un hemocitómetro. El cálculo de la viabilidad se realizó por métodos estándares de uso de hemocitómetro y su valor fue expresado como el porcentaje de células vivas tratadas respecto a las células vivas control (Schilsky y cols., 1998).

### Ensayo de LDH

Se cuantificó adicionalmente la actividad de LDH en el medio de cultivo como un índice de la ruptura celular y de la liberación de esta enzima citosólica en células expuestas a Cu. La cuantificación se realizó como se especifica en el método descrito en el Kit (CytoTox96, Promega).

### Análisis De La Proliferación Celular

Fibroblastos 804 fueron tratados con 50  $\mu$ M de Cu por 24 y 48 h. Alícuotas de aproximadamente un millón de células fueron centrifugadas y resuspendidas en 100  $\mu$ l de PBS. A la suspensión se le adicionó gota a gota 1 ml de etanol 70% por las paredes del tubo en agitación. Se incubaron 10 min en hielo, se centrifugaron y se resuspendieron en 300  $\mu$ l de PBS SFB 2%. Las

muestras fueron analizadas en el Servicio de Citometría de la Clínica Alemana, Santiago, Chile.

#### 2.3.6. CONTENIDO DE GSH

La cuantificación del contenido de GSH se realizó siguiendo las especificaciones del kit (Calbiochem). La preparación de los extractos se realizó de la siguiente manera: 70 mil células por pocillo fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Las células fueron tratadas con 0, 50 y 250  $\mu\text{M}$  de CuHis por 24, 48 y 72 h. Al finalizar la exposición las células fueron recuperadas y resuspendidas en 1 ml de PBS. Se tomó una alícuota para cuantificar proteínas y el resto fue nuevamente centrifugado y resuspendido en 100  $\mu\text{l}$  de ácido metafosfórico 5%. Las muestras se homogenizaron en un homogenizador vidrio/vidrio y centrifugadas a 3000 rpm a 4°C para obtener el sobrenadante utilizado para la cuantificación de GSH. El contenido de GSH se interpola de una curva estándar realizada con GSH comercial (Sigma).

#### 2.3.7. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO CELULAR DE METALES TRAZA.

##### TXRF

El contenido total Cu de las células fue cuantificado por análisis de espectroscopia de fluorescencia de reflexión total de rayos X (TXRF) como se describe en [González y cols., \(1999\)](#) y [Tapia y cols, 2002](#). Para ello, cultivos sub-confluentes de células tratadas y no tratadas con Cu fueron recuperados

por tripsinización, lavados con PBS y cuantificados por azul tripán (ver sec. 5.2). Alícuotas de  $1 \times 10^6$  células fueron lisadas por tratamiento con NaOH 0,1 N en PBS. Una parte de este homogeneizado fue separado para la cuantificación de proteínas, mientras que el resto de la muestra fue digerido con ácido nítrico antes de la medición. La medición se realizó en la Universidad Autónoma de Madrid, España por medio de un convenio entre esta Universidad y la Universidad de Chile.

### AAS

Células tratadas y no tratadas con Cu fueron recuperadas por tripsinización, lavadas con PBS y cuantificadas por azul tripán (ver sec. 5.2). Alícuotas de  $2 - 4 \times 10^5$  células fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. Las pellas de células fueron resuspendidas en ác. nítrico (77  $\mu$ l) y se llevaron a un volumen de 1 ml con agua bi-destilada y desionizada. Las muestras se calentaron a 65 °C toda la noche y el contenido de Cu y Fe fue cuantificado en un Espectrómetro de Absorción Atómica con horno de grafito (SIMMA 6100, Perkin Elmer) con un límite de detección en fracciones de ppb. El contenido de Zn, se cuantificó mediante AAS con horno de llama (2280 Perkin Elmer) que tiene un límite de detección en ppm.

### Contador De Centelleo

La cuantificación de Cu radiactivo ( $^{64}\text{Cu}$ ) se realizó en un contador de centelleo Packard 1600PR. Al finalizar la exposición a  $^{64}\text{Cu}$ , las células crecidas

en placas de 24 pocillos fueron lavadas con PBS y PBS/Cu-His e hidrolizadas directamente con 200  $\mu$ l de tampón de lisis (BL: NaOH 0,5 N /Tritón X-100 0,1%). Se lavó cada pocillo con otros 100  $\mu$ l de BL, el que se sumó a los 200  $\mu$ l anteriores. Se separó una alícuota (50  $\mu$ l) para cuantificar proteínas, y otra alícuota (200  $\mu$ l) fue disuelta en líquido de centelleo (EcoSint H) y cuantificada en un contador de centelleo utilizando un programa específico para registrar la emisión de  $^{64}\text{Cu}$ . Los valores obtenidos fueron interpolados a partir de una curva estándar de concentración conocida (1-50 pmoles  $^{64}\text{Cu}$ ). Dada la corta vida media de la radiactividad de  $^{64}\text{Cu}$  (12.7 h) la curva estándar fue medida cada 24 viales de muestra, lo que corresponde a aproximadamente cada media hora o a un grupo experimental (una placa de 24 pocillos).

### 2.3.8. INCORPORACIÓN CELULAR DE COBRE

La incorporación de Cu se cuantificó exponiendo las células a Cu radioactivo por distintos tiempos (5-120 min) o a concentraciones variables de Cu extracelular (0,1-10  $\mu\text{M}$ ). Luego del tratamiento, las células fueron lavadas con PBS frío y el Cu radioactivo unido inespecíficamente fue desplazado con PBS/Cu-His a una concentración 10 veces superior a la concentración de Cu utilizada. La cuantificación de la radiactividad contenida en las células tratadas se realizó como se especifica en la sección 2.3.7.

### 2.3.9 EXCRECIÓN CELULAR DE COBRE.

Para el análisis de la salida de Cu, se realizó un ensayo de “pulso y caza”. Las células fueron expuestas a distintas concentraciones de  $^{64}\text{Cu}$  por 1 h, lavadas con PBS frío e incubadas nuevamente en medio fresco por distintos periodos de tiempo (0-90 min). Al finalizar el tiempo de caza, las células fueron lavadas con PBS y PBS/CuHis y tratadas para la cuantificación de la radiactividad retenida como se menciona en la sección 2.3.7.

Para los experimentos en que se analiza la ruta de salida del Cu celular, el tiempo de pulso se prolongó a 3 horas, siendo la primera hora a 37 °C y las siguientes 2,5 horas a 20 °C, mientras que la caza se realizó a 37 °C ó a 20 °C dependiendo del objetivo experimental. La exposición a Cu fue a 5  $\mu\text{M}$  y 250  $\mu\text{M}$ . Esta última concentración corresponde a la concentración de Cu extracelular que estimula la relocalización del transportador de Menkes desde el TGN a la membrana plasmática ([Pertis y cols, 1996](#)).

### 2.3.10. CENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL DE HOMOGENIZADOS CELULARES.

Pellas de  $1 \times 10^6$  de células tratadas y no tratadas con Cu, fueron lavadas con PBS y resuspendidas en 1 ml de tampón Hepes Sacarosa (H-S: Hepes 10 mM pH 7.3 Sacarosa 250 mM) a 4°C. La suspensión se homogenizó en un homogenizador vidrio-vidrio y se tomó una alícuota de 25  $\mu\text{l}$  para cuantificar proteínas. El resto del homogenizado fue centrifugado por 5 min a 800 x g a 4 °C para obtener en la pella la fracción de alta densidad (AD). La fracción soluble

se recuperó en un nuevo tubo para microcentrifuga, a partir del cual se tomó otra alícuota para cuantificar proteínas (25  $\mu$ l). El sobrenadante fue centrifugado a 105.000 x g 1 h a 4 °C para obtener las fracciones de densidad media (DM) y baja densidad (BD). Esta última fue resuspendida en 50  $\mu$ l de tampón H-S 0.1% de tritón X-100. Se tomaron 25  $\mu$ l de la fracción BD y 10  $\mu$ l de la DM para la cuantificación de proteínas. Las fracciones fueron llevadas a 1 ml con H-S 5% de ac nítrico y se procedió como se menciona en la sección 2.3.7. para la cuantificación de metales.

#### 2.3.11. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de proteínas se realizó con el reactivo de Bradford (BioRad). Las muestras de proteínas se diluyeron en 800  $\mu$ l de agua y se les agregó 200  $\mu$ l del reactivo de Bradford. Junto a cada grupo de proteínas se leyó una curva estándar que contiene concentraciones conocidas de albúmina de suero de bovino (0-12  $\mu$ g/ml), igual volumen del tampón en que están disueltas las proteínas y agua en cantidad suficiente para llevar la mezcla a 800  $\mu$ l. La cuantificación colorimétrica se realizó en un espectrofotómetro a 595 nm. La concentración de proteínas de las muestras se interpola de la curva de absorbancia del BSA.

#### 2.4. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Los métodos de biología molecular se realizaron como se describe por [Ausubel y cols 1997](#).

#### 2.4.1 MANTENCIÓN DE CULTIVOS DE BACTERIAS

Las cepas de bacterias DH5 $\alpha$  y JM109 utilizadas en esta tesis fueron crecidas en medio líquido LB (Bactotripton 10 gr, extracto de levadura 5 gr, NaCl 10 gr, a pH 7.5) a 37°C en agitación (250 rpm) constante. Se suplementó el medio con ampicilina para el caso de las bacterias transformadas con pCDNA3.1 y kanamicina para las bacterias transformadas con pEGFPC-1.

Para clonar las bacterias éstas fueron sembradas en un medio sólido LB-agar (15 gr/L) en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Para almacenar las células, éstas fueron suspendidas en medio LB suplementado con 15% de glicerol y congeladas a -70°C.

#### 2.4.2 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMIDIAL

El DNA bacteriano fue extraído por el método de lisis alcalina. Una alícuota de 3 ml de un cultivo de bacterias crecidas durante la noche se centrifugó a 13000 rpm por 2 min. Las células se resuspendieron en 200  $\mu$ l de la solución I (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA). Se agitaron en vórtex. Luego se les adicionaron 200  $\mu$ l de la solución II (1% SDS, 0.2 M NaOH). Se invierten dos veces y se les agregó 200  $\mu$ l de acetato de K 3 M. La solución se centrifugó 15 min a 13000 rpm y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Se le adicionó  $\frac{1}{2}$  volumen de fenol y  $\frac{1}{2}$  volumen de cloroformo:isoamilico (24:1). La solución se centrifugó 10 min a 13000 rpm y se recuperó la fase acuosa en un

tubo nuevo. A ésta se le agregó 0.7 vol de isopropanol y se agitó en vórtex. La solución se centrifugó y la pella se lavó con 1 ml de etanol 70%. Se volvió a centrifugar, se removió el etanol y se dejó secar. El DNA fue resuspendido en 20-50  $\mu$ l de agua libre de nucleasas.

Para las preparaciones que requirieron mayor limpieza, el DNA plasmidial fue extraído con el kit "Wizard" para la extracción de minipreparaciones de DNA de la compañía Promega.

#### 2.4.3 EXTRACCIÓN DE RNA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO

Cultivos celulares mantenidos en placas de 96 mm fueron recuperados por tripsinización. A la pella de células se le adicionó 2 ml del reactivo Trizol, se homogenizó suavemente con una micropipeta y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Se le adicionó 0.2 ml de cloroformo por ml de Trizol original (0.2 ml/ml de Trizol), se agitó vigorosamente y se incubó por 2-3 min a temperatura ambiente. La solución fue centrifugada a 12000xg por 15 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa (transparente) en un tubo nuevo. El RNA se precipitó con 0.5 ml/ml Trizol de alcohol isopropílico, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000xg por 15 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la pella con 1 ml/ml Trizol de etanol 75%. Se agitó en vórtex y se centrifugó a 7500xg por 5 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y la pella se dejó secar a temperatura ambiente por algunos minutos. El RNA se resuspendió en agua libre de nucleasas con la ayuda de una micropipeta y calentando la solución a 60 °C por 10 min.

#### 2.4.4. CUANTIFICACIÓN DE DNA Y RNA

Las extracciones de DNA plasmidial y RNA de células de mamífero fueron cuantificadas en un espectrofotómetro Perkin Elmer MBA 2000. Para ello, alícuotas de ácido nucleico (1-2  $\mu$ l) fueron diluïdos en agua (70  $\mu$ l), depositados en una cubeta de cuarzo y cuantificados a 260 y 280 nm. El espectrofotómetro utilizado esta equipado con la información para calcular a partir de la lectura de densidad óptica la concentración de DNA, RNA, doble hebra o hebra simple según sea el origen de la muestra.

#### 2.4.5. ELECTROFORÉSIS EN GELES DE AGAROSA

Muestras de DNA fueron diluidas en tampón de carga (glicerol 10%, EDTA 0,01 M, pH: 8,0, azul de bromofenol 0,25%) y calentadas a 60 °C por 5 min. Éstas fueron luego separadas en geles de agarosa 1% en TBE (Tris-HCl 0,045 M, pH: 8,0, ácido bórico 0,045 M y EDTA 2 mM) que contenían bromuro de etidio 1  $\mu$ g/ml y se corrieron en tampón TBE a un voltaje constante de 70-100 V.

#### 2.4.6. ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA

Alícuotas de DNA fueron separados en geles de acrilamida al 8% en condiciones denaturantes. Para ello, se preparó un gel de acrilamida como se describió anteriormente para proteínas sección 2.3.11.

#### 2.4.7. DIGESTIÓN DE VECTORES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las digestiones para determinar la presencia y orientación de un DNA insertado en un plasmidio se realizaron con 1  $\mu\text{g}$  de DNA, el que fue incubado por 2 h a 37 °C con 1 U de cada enzima en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  en los tampones particulares para cada enzima, provistos por los fabricantes. El resultado de la digestión se verificó en geles de agarosa. Para la purificación de vectores o fragmentos de DNA se realizaron digestiones con mayores cantidades de DNA y los fragmentos fueron resueltos en geles de agarosa “low melting point” (LMP). Las muestras fueron calentadas previamente a 65°C por 5 min para inactivar las enzimas de digestión.

#### 2.4.8. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA

Tanto vectores como fragmentos de DNA digeridos con enzimas de restricción se recuperaron luego de ser separados en geles de agarosa LMP 1%. Para ello, se cortaron las bandas del gel y se recuperaron separadamente en un tubo de 0,6 ml que tiene un embudo de papel filtro y una perforación en su fondo. Cada tubo fue posado sobre un tubo de 1,5 ml y fueron centrifugados a 8000 rpm por 10 min a 4 °C. El tubo de 0,6 ml fue lavado con 100  $\mu\text{l}$  de TE y centrifugado nuevamente. El DNA contenido en la solución acuosa recuperada en el tubo de 1,5 ml fue concentrado mediante precipitación.

#### 2.4.9. PRECIPITACIÓN DE DNA

Las muestras de DNA se precipitaron con 0.1 volumen de Acetato de Na 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron a 13000 rpm por 40 min y las pellas se lavaron con 1 ml de etanol 70% frío. Las muestras se centrifugaron nuevamente y se eliminó el etanol con una micropipeta. Las pellas se dejaron secar y fueron resuspendidas en 20-50  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas.

#### 2.4.10. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA EN UN VECTOR

Para la ligación de un fragmento de DNA en un vector, ambos DNAs fueron limpiados previamente con el kit Wizard Clean Up o Wizard Gen Clean. La ligación fue realizada utilizando la enzima T4 DNA ligasa, el tampón de la enzima provisto por el fabricante y agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para completar 10  $\mu\text{l}$ . La reacción se mantuvo por 3 h a temperatura ambiente y se detuvo calentándola a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min. La eficiencia de la reacción se analizó separando una alícuota de la mezcla de reacción en un gel de agarosa al 1%.

#### 2.4.11. TRANSFORMACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Bacterias competentes fueron transformadas con el producto de la ligación. Para ello, se descongelaron 30  $\mu\text{l}$  de célula competentes (DH5 $\alpha$  o JM109) en hielo. Bajo la llama de un mechero se traspasaron a tubos cónicos de 15 ml. Se

les agregó a cada tubo 2 µl de la mezcla de ligación. Se agitaron suavemente y se mantuvieron en hielo por 30 min. Durante este período se preparó el medio SOC (9.8 ml SOB (Bacto triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 0,5 g/L, 2.5 mM KCl pH 7.0) y 0.2 ml de glucosa 20% (p/v) filtrados con un filtro de poro de 0,2 µm y se calentó a 42°C. Terminado el tiempo de incubación, se les dio un pulso de calor a las bacterias a 42 °C por 45 seg y se incubaron nuevamente en hielo por 2 min. Se les agregó a cada tubo 0.45 ml de SOC se mantuvieron a 37 °C por 1 hr con agitación (225-250 rpm). Se centrifugaron por 10 min a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante y la pella de bacterias se resuspendió en 50 µl de SOC. Las bacterias fueron sembradas en placas de LB-agar con el antibiótico de resistencia del vector utilizado. Las placas fueron incubadas a 37°C toda la noche y al día siguiente se tomó una punta de mondadiente para crecer en LB de algunas colonias para su análisis.

#### 2.4.12. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El análisis de la presencia y el sentido de la inserción de MT I en pcDNA3.1 se realizó mediante PCR. Para ello se preparó una mezcla con 50 ng de los DNA muestrales, 300 ng del partidador MT-12 y 300 ng del partidador MT-10, 7.5 µl de la mezcla de PCR (1.5 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTPs 10 mM, 5 µl tampón de la polimerasa 10X) 0.5 µl de la Taq DNA Polimerasa y agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para 50 µl.

Los ciclos utilizados fueron los siguientes:

Ciclo 1: 5 min a 94°C

Ciclo 2: 1 min a 94°C

Ciclo 3: 1 min a 60°C

Ciclo 4: 1 min a 72°C

Ciclo 5: repetir 35 veces los ciclos 2 a 4

Ciclo 6: 5 min a 72°C

Ciclo 7: indefinido a 4°C

#### 2.4.13. PCR SEMICUANTITATIVO (MULTIPLEX)

El protocolo de PCR Múltiplex se realizó según el protocolo descrito por [Henegariu y cols, 1997](#). Inicialmente, se determinó el número de ciclos adecuado para que la amplificación de los genes que codifican para la isoforma I de MT y para GDPH (gen que se expresa en forma constitutiva) estuviese en fase exponencial. Para el ensayo se extrajo RNA total de las muestras de fibroblastos, del cual se utilizaron 2 µg para generar una población de cDNA. Para la amplificación por PCR se utilizaron 0.5 µg del cDNA con los respectivos partidores utilizando el siguiente programa:

1 ciclo a 94°C por 30 seg y 24 ciclos con

1) 30 seg a 56 °C

2) 2 min a 68 °C

3) 10 min a 68 °C

Los productos obtenidos fueron separados en un gel de agarosa al 1,2 % y la intensidad de la bandas fue cuantificada mediante densitometría usando el

programa Kodak Digital Science 1D (Kodak). Finalmente, la expresión diferencial de los genes se obtuvo cuantificando la intensidad del gen de MT relativa a la del gen control (GDPH).

#### 2.4.14. MACROARREGLO

El protocolo para el ensayo de macroarreglo fue desarrollado en nuestro laboratorio, constituyendo parte de la tesis para obtener el grado de Licenciado en Biotecnología de la Sra. Mónica Cisternas.

Se identificaron secuencias de 250 pb de alta y baja homología para cada gen, con relación a las secuencias del grupo de genes utilizados en el macroarreglo, mediante un programa Redigen. Las homologías fueron verificadas nuevamente en otros programas de alineamiento, BLAST y ClustalW. Se diseñaron los partidores de las secuencias escogidas, utilizando el programa Primer Premier v 5.0, los que se especifican en la sección 2.1.4. Las secuencias de interés fueron amplificadas por PCR y clonadas en un vector pGEM-T, el que fue utilizado para transformar bacterias de tal manera de almacenar y amplificar los DNAs de interés. El DNA vectorial conteniendo como insertos las secuencias de los genes a analizar fueron cuantificados y diluidos en una placa de 96 pocillos (0.5-1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Desde ella, utilizando un “sembrador” manual, se depositan sobre las membranas de nylon los genes representados como puntos en la membrana los cuales tienen una localización y concentración conocida. El sembrador, deposita cada vez que toca la membrana 0.1  $\mu\text{l}$  de muestra, por lo que una mayor cantidad de DNA es

obtenida tras múltiples “toques” del sembrador sobre los mismo puntos. Las membranas luego son tratadas en un ciclo de denaturación, fijado y prehibridación como sigue:

La denaturación se realizó sumergiendo las membranas en una solución de 0.5M NaOH y 1.5M NaCl por 7 min sin agitación. Luego, la neutralización se realizó con dos lavados en una solución 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris pH 7.4 y 1 mM EDTA con agitación durante 3 minutos. Se secaron a temperatura ambiente y el DNA fue fijado por entrecruzamiento con luz ultravioleta por 45 segundos. Posteriormente viene una fase de pre-hibridación, en la cual las membranas son incubadas una hora a 42 °C con 2.5 ml del tampón 1x Prehybridization buffer/Hyb sol, 0.2x tampón fosfato de sodio, pH 6.5, 40% Formamida y 1% SDS.

Para hibridar las membranas, se extrajo RNA total de los fibroblastos con el que se generó una población de cDNA. Ésta fue marcada con <sup>33</sup>P según el protocolo especificado por un kit de marcación Gibco. Las muestras fueron denaturadas a 100 °C por 10 min y enfriadas en hielo. La hibridación de esta solución con las membranas se realizó a 42 °C toda la noche. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas de la siguiente manera:

- 10 min a temperatura ambiente con sol. 2x SSC I
- 10 min a temperatura ambiente con sol. 2x SSC, 0.1% SDS
- 15 min a 65°C con sol. 1xSSC, 0.1% SDS
- 15 min a 65°C con sol. 1xSSC, 0.1% SDS
- 15 min a temperatura ambiente con sol. 0.1x SSC
- 15 min a temperatura ambiente con sol. 0.1x SSC

Las membranas hibridadas se expusieron a films auto radiográfico a  $-80^{\circ}\text{C}$  por al menos 2h. El revelado se realizó por métodos estándares de revelado fotográfico.

El análisis del macroarreglo se realizó cuantificando la intensidad de la señal en cada gen. Al valor obtenido se les resta la señal del ruido y el obtenido a partir de las muestras control (agua y vector de clonamiento).

#### 2.4.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los experimentos fueron realizados por triplicado, y analizados por pruebas de t y ANOVA ([Zar, 1984](#)) utilizando el Programa SYSTAT 9.0. Las diferencias son consideradas significativas cuando  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

El Cu en mamíferos, se absorbe en el tracto gastrointestinal y es transportado vía portal al hígado desde donde se incorpora al flujo sanguíneo sistémico. El epitelio intestinal y el tejido hepático constituyen los puntos de regulación más importantes para mantener un suministro adecuado del metal a los demás tejidos del organismo y, por lo tanto, han sido objeto de numerosos estudios dirigidos a entender el metabolismo celular de Cu. Sin embargo, la gran capacidad de estos tejidos para resistir fuertes fluctuaciones en la exposición a Cu ha promovido el análisis de la función de MT, principalmente frente a la exposición supra-fisiológica del metal. En esta tesis, se utilizaron fibroblastos en cultivo como un modelo biológico que representa a tipos celulares no especializados en la regulación sistémica de Cu, centrando el estudio en un análisis comparado del metabolismo celular del metal entre una línea celular que expresa MTI/II y otra que carece de estas proteínas.

### **LÍNEAS DE FIBROBLASTOS SILVESTRES Y MUTANTES PARA MT I/II.**

#### **Contenido de metales traza en el medio de cultivo.**

El análisis del contenido de Cu, Fe y Zn vía TXRF (ver sec. Materiales y Métodos) medido en los diferentes componentes del medio de cultivo ([Tabla 1](#)),

indica que el SBF aporta la mayor parte de cada uno de ellos. En humanos la concentración de Cu plasmático es 15-20  $\mu\text{M}$  (Linder y cols, 1998), de éste un 70-90% se encuentra unido a ceruloplasmina (Cu-Cp) y un 10–30% unido a albúmina o a aminoácidos como glicina e histidina (Cu-noCp), siendo el Cu-noCp considerado como disponible para su utilización en las células. Por lo tanto, en condiciones fisiológicas el contenido de Cu-noCp en el plasma es 3 a 12 veces mayor que la concentración medida en DMEM 10% de SBF. En atención a estos cálculos la concentración basal de Cu en el medio de cultivo (0,44  $\mu\text{M}$ ) fue considerada como sub-fisiológica. El tratamiento de las células a una concentración fisiológica y supra-fisiológica de Cu-noCP fue considerado al suplir el medio de cultivo con 5 y 50  $\mu\text{M}$  ó más de Cu-His respectivamente.

**Tabla 1.-Concentración basal de Cu, Fe y Zn en el medio de cultivo y en el plasma.**

	Cu ( $\mu\text{M}$ )*	Fe ( $\mu\text{M}$ )	Zn ( $\mu\text{M}$ )
DMEM	0.24	1.72	0.44
SFB	1.12	25.31	18.04
DMEM 10% SBF	0.44	3.80	2.69
Suero humano**	15-20	8-12	10-15

\*La concentración de Cu, Fe y Zn en los diferentes componentes del medio de cultivo fue determinada por TXRF. (n=3), la ds fue menor al 5%.

\*\* ref.: Cu (Linder y cols 1998); Fe (Yip y cols 1984); Zn (Iyengar y cols., 1978).

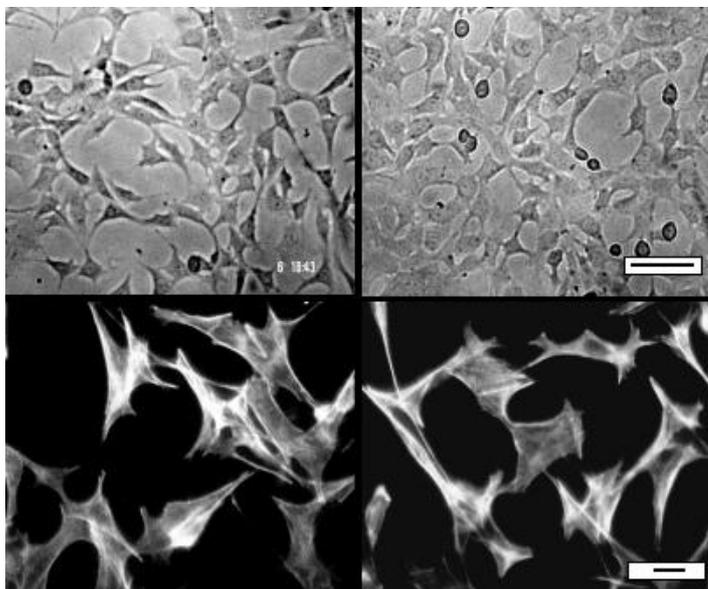
**La ausencia de MT no modifica la morfología celular ni la tasa de crecimiento de fibroblastos mantenidos en cultivo a concentraciones sub-fisiológicas de Cu.**

Las líneas de fibroblastos mutantes y silvestres utilizadas en esta tesis fueron caracterizadas en cuanto a su morfología y capacidad de crecimiento en un medio de cultivo sin suplemento de Cu-His, es decir, a una concentración sub-fisiológica de Cu-noCp.

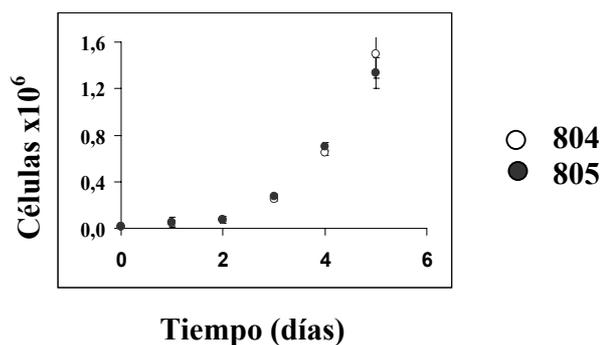
Estas líneas celulares presentaron un tamaño y morfología muy similar bajo la observación mediante microscopía de luz (Figura 2, paneles superiores), tampoco se observaron diferencias obvias a nivel de la organización del citoesqueleto de actina (Figura 2, paneles inferiores). El análisis del patrón de crecimiento de fibroblastos mutantes y silvestres indica que ambas líneas celulares tienen una curva de crecimiento similar (Figura 3). El tiempo de duplicación calculado a partir de estas curvas es de aproximadamente 22 h. Una vez sembradas, las células presentaron una fase de crecimiento lento seguida de una fase de crecimiento logarítmico hasta alcanzar la confluencia, donde ellas presentan inhibición de su crecimiento por contacto celular. En cultivos sub-confluentes, se determinó que el contenido total de proteínas presente en extractos celulares para ambas líneas celulares fue de aproximadamente  $300 \mu\text{g} \times 10^6$  células.

804

805



**Figura 2. Morfología de fibroblastos silvestres y mutantes.** En los paneles superiores se muestran fotografías de cultivos sub-confluentes de fibroblastos mutantes (804) y silvestres (805) observados bajo microscopio de luz invertida. En los paneles inferiores se muestra la inmunolocalización de actina mediante inmunofluorescencia indirecta. Las barras representan una longitud de 10  $\mu\text{m}$ .

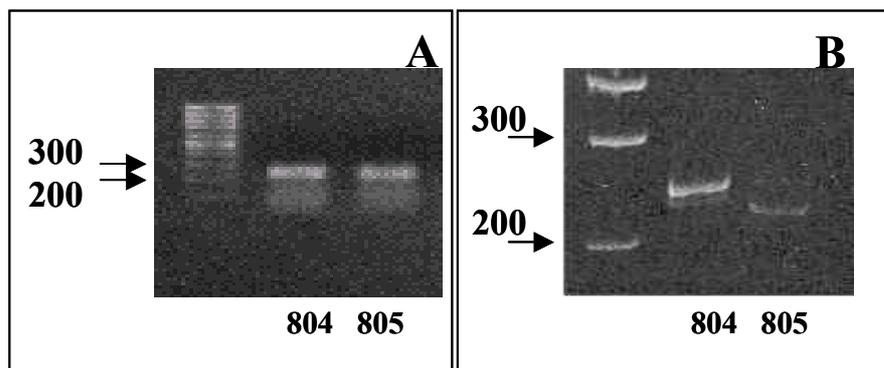


**Figura 3. Tasa de crecimiento de fibroblastos silvestres y mutantes.** Cultivos celulares de fibroblastos mutantes (804) y silvestres (805) mantenidos en las condiciones basales de cultivo fueron cuantificados diariamente por el método de exclusión con azul tripán. Los valores corresponden al promedio de una triplicado y su desviación estándar.

Estos resultados indican que, a una concentración sub-fisiológica de Cu, no existen diferencias observables tanto en la morfología como en la capacidad de proliferar entre fibroblastos mutantes y silvestres.

### **Los fibroblastos mutantes expresan una forma alterada de la isoforma I del gen de MT.**

Con la intención de analizar la expresión del gen de la isoforma I de MT, se extrajo RNA total de muestras de fibroblastos mutantes y silvestres mantenidos a una concentración sub-fisiológica de Cu (0,44  $\mu$ M). A partir del RNA total, se generó una población de cDNA el que fue utilizado para la amplificación por PCR de MT utilizando partidores específicos para el gen de la isoforma I. Los productos obtenidos con este procedimiento fueron separados en un gel de agarosa al 1,2 % y teñidos con bromuro de etidio. En la **Figura 4 A**, se muestra que en ambas líneas celulares se amplificó un producto único del tamaño esperado para la isoforma I de MT (230 pb aprox). Dado que la mutación fue realizada mediante la inserción de secuencias de término de la traducción en las isoformas I y II de MT, el producto amplificado a partir del RNA extraído de la línea mutante debe ser ligeramente mayor al purificado de la línea silvestre (15 pb). Para visualizar esta diferencia de tamaño, los productos amplificados por PCR fueron separados en un gel de acrilamida al 8% en condiciones denaturantes (**Figura 4 B**), el resultado confirmó que en la línea 804 el gen que codifica para MT I se transcribe en un producto de mayor tamaño.



**Figura 4. Amplificación por PCR de un transcrito correspondiente a la isoforma I del gen de MT.** Se extrajo una muestra de RNA total de fibroblastos mutantes (804) y silvestres (805), con el que se sintetizó cDNA. A partir de éste, se amplificó por PCR un transcrito correspondiente a MT utilizando partidores específicos para la isoforma I del gen. En el panel A, se muestran los productos de PCR para cada línea celular separados en un gel de agarosa al 1,2 % y teñidos con Bromuro de Etidio. En el panel B, se muestra la separación de los mismos productos de PCR en un gel de acrilamida al 8 % en condiciones denaturantes.

Estos resultados muestran que ambas líneas celulares expresan un transcrito que corresponde a la isoforma I del gen de MT y que en la línea mutante el producto amplificado es de mayor tamaño.

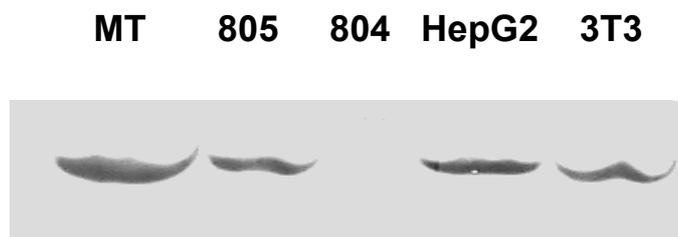
#### **Los fibroblastos mutantes no expresan la proteína de MT.**

Con la intención de determinar si la inserción en el gen que codifica para MT I efectivamente afecta su traducción, se generaron extractos celulares de fibroblastos mutantes y silvestres a partir de los cuales se preparó una fracción enriquecida de MT. Alícuotas de estas fracciones fueron separadas mediante SDS-PAGE e inmunomarcadas utilizando un anticuerpo monoclonal contra MT I

y II. En la **Figura 5** se observa la tinción de una banda inmunoreactiva en las muestras correspondientes a la línea silvestre y control (MT purificada de hígado de conejo), las que tuvieron un tamaño similar al descrito para MT fraccionado en geles de poliacrilamida (aprox. 12 kDa). No se detectó una banda inmunoreactiva a esta altura en la muestra de proteínas provenientes de la línea mutante (804). Este resultado confirma que la inserción en los genes que codifican para MT I y II afecta la traducción de ambas proteínas.

El nivel de expresión de MT en 805 fue comparado con la expresión detectada en otras líneas celulares, una hepática humana (HepG2) y otra de fibroblastos de ratón (3T3). El análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas en relación a la carga de proteínas utilizadas en el ensayo mostró que fibroblastos 805 y 3T3 tienen un nivel de expresión de MT 6 veces menor que la línea HepG2 (**Figura 5**).

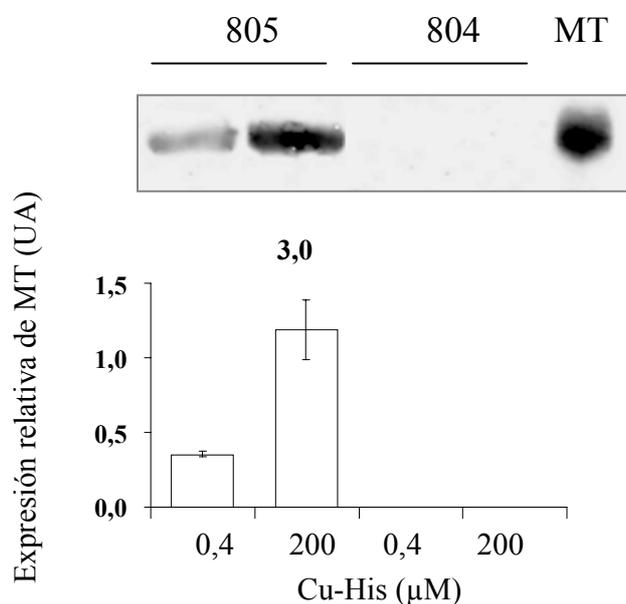
Estos resultados muestran que los fibroblastos silvestres mantenidos a concentraciones sub-fisiológicas de Cu, expresan MT I y II, y que el nivel de su expresión es equivalente a la observada en otra línea de fibroblastos (3T3) y menor a la observada en una línea de hepatocitos (HepG2). La línea mutante al contrario, no expresa las isoformas I y II de MT.



**Figura 5.- Análisis de la expresión de la proteína de MT en líneas celulares de mamífero en cultivo.** Se prepararon extractos enriquecidos de MT a partir de líneas celulares de fibroblastos 805, 804, 3T3 y hepatocitos HepG2 en cultivo. Alícuotas correspondientes a 20  $\mu$ g de los extractos de fibroblastos, 3,5  $\mu$ g del extracto de hepatocitos y una muestra de MT de hígado de conejo fueron cargadas en un gel SDS-PAGE al 12,5 %. Las proteínas separadas fueron electrotransferidas a una membrana de PDVF e inmunomarcadas con anticuerpos contra MT I/II. La unión de los anticuerpos con su antígeno fue revelada mediante la formación de un producto colorado que se forma de la reacción de la peroxidasa con el sustrato DAB.

#### **La expresión de la proteína de MT es inducida por Cu en fibroblastos silvestres.**

El aumento en el nivel de expresión de MT en células expuestas a Cu constituye una de las características más sobresalientes descritas para esta proteína, y una evidencia clara de la relación de MT con el metabolismo celular de Cu. Por tal motivo, se evaluó si la expresión de MT es inducida por la exposición a Cu en fibroblastos 805 y 804 expuestos por 24 h a una concentración supra-fisiológica del metal (200  $\mu$ M Cu-His). Para ello, un extracto de proteínas enriquecido en MT fue analizado mediante ensayos de Western Blots utilizando un anticuerpo monoclonal anti MT I/II. En la [Figura 6](#) se observan bandas inmunoreactivas a la altura en que migra la proteína MT



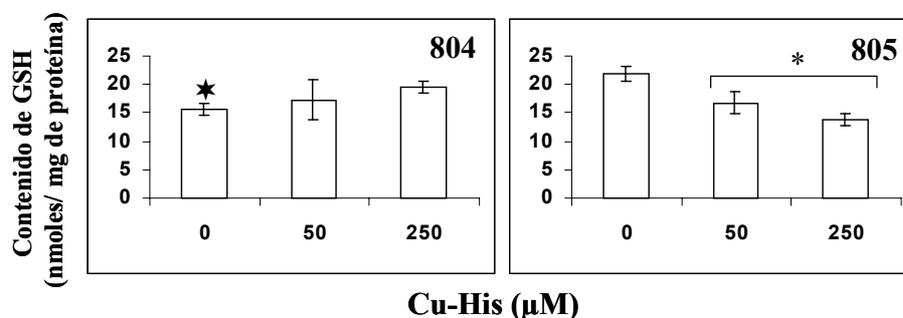
**Figura 6.- Análisis de la inducción de la proteína de MT por la exposición a Cu de fibroblastos en cultivo.** Fibroblastos mutantes (804) y silvestres (805) fueron suplementados con 0 (control) y 200  $\mu\text{M}$  de Cu-His por 24 h. Se prepararon extractos enriquecidos de MT y se separaron alícuotas correspondientes a 10  $\mu\text{g}$  de cada muestra en un gel de acrilamida al 12,5 % junto a una muestra de MT de hígado de conejo. Las proteínas fueron inmunomarcadas como se explica en la leyenda de la Figura 4 y la unión de los anticuerpos anti-MT con su antígeno fue revelada con un sustrato quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina (CDP). El gráfico muestra el análisis por densitometría de las membranas correspondientes a dos experimentos independientes. La intensidad cuantificada para cada banda fue normalizada con la señal obtenida en la muestra de MT de hígado de conejo.

purificada (12 kDa) para muestras obtenidas tanto en fibroblastos no expuestos y expuestos a Cu. Además, se observa que aún en condiciones de sobre-exposición a Cu, no es posible detectar la expresión de MT I/II en los fibroblastos mutantes. El nivel de expresión de MT fue cuantificado mediante un análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas. En el gráfico de la

**Figura 6** se muestra la razón entre la intensidad de las señales cuantificada para los fibroblastos silvestres (tratados y no tratados con Cu) y para la muestra de MT purificada. El resultado indica que la expresión de MT en los fibroblastos expuestos a Cu aumentó 3 veces en relación con los fibroblastos no expuestos al metal.

**Fibroblastos mutantes tienen un menor contenido basal de GSH y su contenido no cambia en respuesta a la exposición a Cu.**

Considerando que GSH y MT unen prácticamente la totalidad del Cu que ingresa a la célula, y que ambos componentes son capaces de almacenar el metal y transferirlo a las diferentes cuproproteínas, se evaluó si en los fibroblastos mutantes la ausencia de MT se correlaciona con un cambio en el contenido celular de GSH. Los resultados indican que en fibroblastos mantenidos en un medio de cultivo sin suplemento de Cu ( $0,44 \mu\text{M}$  Cu), el contenido de GSH en los fibroblastos silvestres fue significativamente (25%) más alto que el de los fibroblastos mutantes ( $21.8 \pm 1.3$  y  $15.8 \pm 1.0$  nmoles/mg de proteínas, respectivamente) (Figura 7). Al exponer los fibroblastos silvestres a concentraciones supra-fisiológicas ( $50$  y  $250 \mu\text{M}$  de Cu-His) por 24 h, se observó, una disminución significativa en el contenido de GSH respecto al contenido observado en fibroblastos no expuestos a Cu (Figura 7). El contenido de GSH observado en los fibroblastos silvestres fue similar al encontrado por

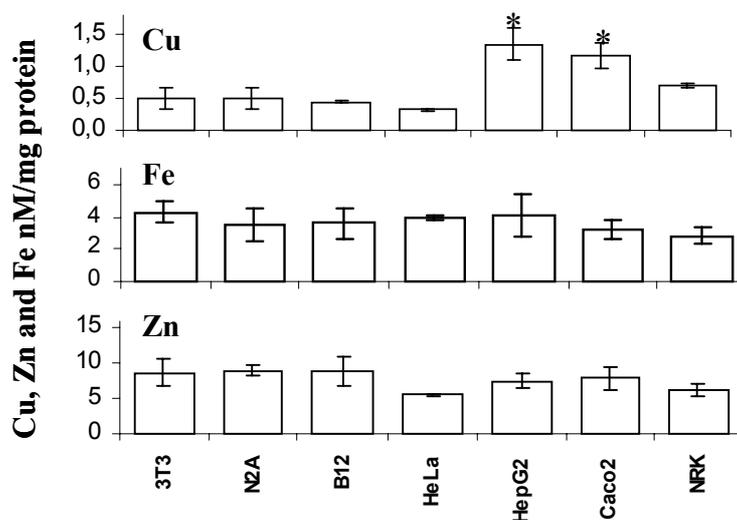


**Figura 7.- Contenido de GSH en fibroblastos tratados con Cu.** Fibroblastos mutantes (804) y silvestres (805) fueron tratados con 0, 50 y 250  $\mu\text{M}$  de Cu-His por 24 h. El contenido de GSH fue cuantificado mediante un kit Calbiochem y normalizado por el contenido de proteínas. Se graficaron los valores promedio de un triplicado y su desviación estándar. El (\*) denota una diferencia significativa del valor obtenido en los tratamientos respecto al control para cada línea celular. El (★) denota una diferencia significativa en el contenido de GSH entre las líneas celulares en las condiciones basales de cultivo. ( $p < 0.05$ )

otros investigadores en otras líneas celulares, al igual que la disminución en respuesta a la exposición a Cu (ver sec. Discusión). En los fibroblastos mutantes en cambio, el contenido de GSH no cambia en forma significativa con la exposición a 50 ó 250  $\mu\text{M}$  de Cu-His. Las diferencias observadas en los fibroblastos mutantes en cuanto al contenido celular de GSH en condiciones basales de cultivo (0,44  $\mu\text{M}$  Cu) y a la ausencia de variación cuando son expuestos a concentraciones supra-fisiológicas del metal, sugieren que el mecanismo que regula la tasa de síntesis y/o degradación de GSH se encuentra alterado en los fibroblastos que carecen de MT.

### **Fibroblastos mutantes y silvestres crecidos en condiciones basales de cultivo tienen igual contenido Cu, Fe y Zn.**

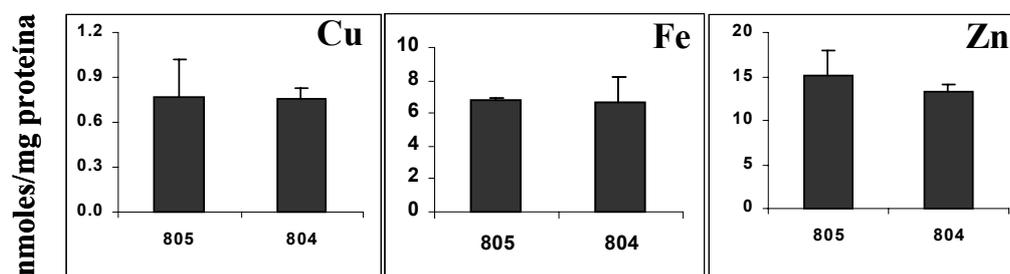
Considerando que MT es capaz de unir Cu y Zn y que variaciones en el contenido celular de estos elementos pueden alterar el metabolismo celular de Fe, se desarrolló un procedimiento para medir en forma precisa el contenido celular de estos tres elementos vía TXRF y AAS. En nuestras condiciones experimentales se logró detectar en forma simultánea el contenido total de Cu, Fe y Zn en una cantidad mínima de células ( $0,3 - 2 \times 10^6$ ). Los gráficos de la **Figura 8** muestran que, cuando las células son mantenidas en un medio de cultivo con una concentración basal de metales traza, el contenido de cada metal es relativamente constante entre las líneas celulares, salvo en HepG2 y Caco-2 las cuales presentaron un contenido significativamente mayor de Cu ( $P < 0.05$ ). El análisis de los valores de contenido de Cu, Fe y Zn, indica que independientemente del origen (ratón, rata o humano) y del tipo celular (fibroblasto, hepatoma, neuroblastoma, etc) al que corresponde cada línea celular, en todas ellas el orden de abundancia relativa de los metales traza fue  $Cu < Fe < Zn$ . En la **Figura 9** se grafican los valores correspondientes al contenido de Cu, Fe y Zn para fibroblastos 805 y 804 crecidos en condiciones basales de cultivo (Cu,  $0.77 \pm 0.26$  y  $0.75 \pm 0.07$ ; Fe,  $6.83 \pm 0.1$  y  $6.65 \pm 1.5$  Zn  $15.07 \pm 2.9$  y  $13.2 \pm 0.85$  nmoles/mg proteínas respectivamente). Los datos indican que el contenido total de Cu, Fe y Zn fue muy similar entre ambas líneas celulares y que estas expresan el mismo patrón de abundancia relativa de metales traza observado en las demás líneas celulares.



**Figura 8.- Contenido de metales traza en líneas celulares de mamíferos.** El contenido de Cu, Fe y Zn fue cuantificado por TXRF en muestras de  $1 \times 10^6$  células de siete líneas celulares de mamíferos. Los valores en el gráfico corresponden a un triplicado y su desviación estándar. Las diferencias en el contenido celular para cada metal fueron consideradas significativas con  $P < 0.05$ .

En conjunto los resultados obtenidos de la cuantificación de Cu, Fe y Zn indican que bajo un régimen de exposición sub-fisiológica de Cu, los fibroblastos 805 y 804 en cultivo contienen niveles similares de metales traza al observado en otras líneas celulares. El orden de abundancia relativa de Cu, Fe y Zn fue igual en todas las líneas celulares analizadas, sugiriendo la existencia de un mecanismo celular común destinado a mantener a estos tres elementos en un cierto nivel de abundancia relativa. Por otra parte, la igualdad en el contenido total de Cu en fibroblastos que carecen de MT y silvestres, sugiere que el contenido del metal en la célula mantenida en las condiciones basales de cultivo celular, debe estar definido por el requerimiento en la incorporación en

cupro-enzimas y su asociación con los demás componentes celulares encargados de su transporte y manejo intracelular (chaperonas de Cu, GSH, transportadores).



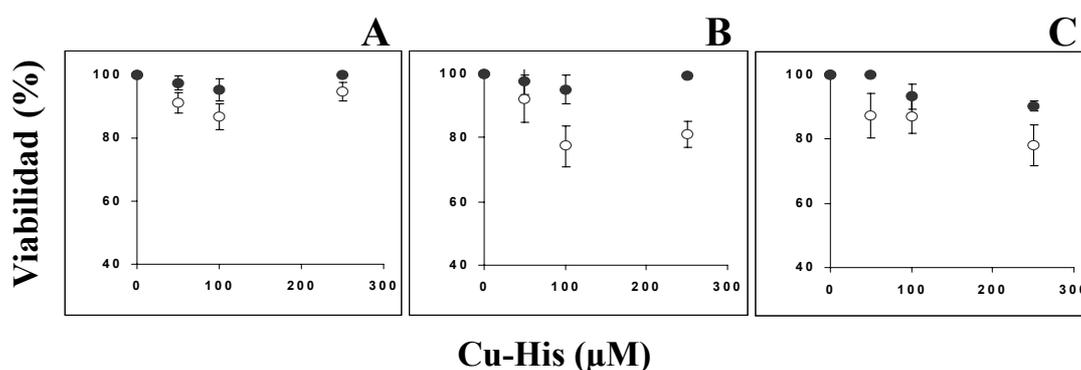
**Figura 9.- Contenido de Cu, Fe y Zn en fibroblastos mutantes (804) y silvestres (805).** Alícuotas correspondientes a  $0.3 \times 10^6$  células mantenidas en condiciones basales de cultivo fueron analizadas en su contenido de Cu, Fe y Zn cuantificado por AAS, el cual fue normalizado por el contenido de proteínas. Los valores representan el promedio de un triplicado y su desviación estándar. Se realizó una prueba de t y las diferencias fueron consideradas significativas con  $P < 0.05$

## **ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR Y DEL CONTENIDO DE METALES TRAZA EN FIBROBLASTOS MUTANTES Y SILVESTRES EXPUESTOS A Cu.**

**Fibroblastos silvestres son más resistentes frente a la exposición a concentraciones supra-fisiológicas de Cu que los fibroblastos mutantes.**

Con el ánimo de analizar la relación entre la presencia de MT y la viabilidad celular durante la exposición a Cu, fibroblastos mutantes y silvestres en cultivo fueron expuestos a concentraciones supra-fisiológicas del metal. En estos experimentos, ambas líneas celulares fueron mantenidas en cultivo por 24, 48 y 72 h, con un suplemento de Cu extracelular de 0 a 250  $\mu\text{M}$  Cu-His. La viabilidad de las células tratadas fue cuantificada mediante ensayos de reducción de MTT, los valores de reducción fueron expresados en porcentaje de actividad siendo el 100% la actividad de reducción de MTT medida en las células no expuestas a Cu para cada línea celular. En la **Figura 10** se observa que el nivel de reducción de MTT de los fibroblastos silvestres disminuye a medida que la concentración de Cu en el medio de cultivo supera los 100  $\mu\text{M}$ , lo cual resulta especialmente evidente a las 72 h de exposición. Este efecto se observa en los fibroblastos mutantes desde los 50  $\mu\text{M}$  de Cu extracelular en tiempos menores a 48 h. En general, el porcentaje de actividad de reducción de MTT fue más alto en los fibroblastos 805 que en los fibroblastos mutantes (entre 10 y 20%), para

cualquiera de las concentraciones de Cu utilizadas en los diferentes tiempos de exposición estudiados. Resultados similares fueron obtenidos calculando la



**Figura 10.- Viabilidad celular en fibroblastos tratados con concentraciones supra-fisiológicas de Cu-His.** Fibroblastos mutantes (804) y silvestres (805) fueron tratados por (A) 24 h, (B) 48 h y (C) 72 h con 0, 50, 100 y 250  $\mu\text{M}$  de Cu-His. La viabilidad celular se determinó mediante la reducción de MTT y el valor correspondiente a las células tratadas fue expresado como porcentaje respecto al de las células no tratadas. Los valores graficados corresponden al promedio de un tetraplicado y su desviación estándar.

viabilidad celular a partir del recuento de células que excluyen azul tripán (datos no mostrados). En conjunto estos resultados sugieren que fibroblastos mutantes para MT presentan una menor viabilidad en función de la concentración como del tiempo de exposición a Cu, sin embargo, estos datos no permiten descartar la posibilidad que la exposición al metal no afecte en forma diferencial la tasa de crecimiento de ambas líneas celulares. Por tal motivo se realizaron ensayos de viabilidad celular en los cuales se cuantificó tanto las células que excluyen (células vivas) como las que incluyen (células muertas) azul tripán a fin de

detectar cambios en el número total de células presentes al final del periodo de tratamiento. El resultado mostró que en ambas líneas de fibroblastos el número de células muertas en función del tratamiento con Cu, se relaciona con lo observado mediante el ensayo de MTT, siendo el número total de células equivalentes en los fibroblastos tratados y no expuestos al metal. Adicionalmente, por citometría de flujo se evaluó el efecto de la exposición a 50  $\mu\text{M}$  de Cu extracelular sobre el ciclo celular en los fibroblastos mutantes. Utilizando esta metodología se pudo observar que el  $40.7\% \pm 5.4$  de la población no expuesta a Cu se encuentra en las fases G2/M+S, este valor no cambia a las 24 o 48 h de exposición al metal (porcentaje de células en las fases G2/M+S,  $40.0 \pm 4.9$  y  $38.6 \pm 1.2$ , respectivamente). Estos resultados indican que la exposición a Cu no repercute en la tasa de crecimiento de las células durante el periodo de tratamiento y apoyan la idea que MT es parte de un mecanismo que incrementa la resistencia celular frente a la exposición al metal.

### **Fibroblastos silvestres acumulan Cu a una tasa mayor que los fibroblastos mutantes a concentraciones iso- y supra-fisiológica de Cu.**

Considerando que la disminución en la viabilidad de los fibroblastos expuestos a Cu podría ser consecuencia de un aumento del Cu intracelular, se evaluó el nivel de acumulación del metal en células expuestas por diferentes tiempos (horas a días) a concentraciones variables de Cu-His.

En una primera aproximación se determinó el nivel de acumulación de Cu en fibroblastos mutantes y silvestres transferidos desde un medio de cultivo sin suplemento de Cu, a otro con una concentración fisiológica del metal (5  $\mu\text{M}$  Cu-His) por periodos de tiempo de 3 y 24 h. Considerando que en estas condiciones el nivel de acumulación del Cu recién incorporado (en el rango de pmoles), representa sólo una fracción del contenido total de Cu (en el rango de nmoles), resulta difícil medir en la célula los cambios de acumulación del metal. Por tal motivo, en estos ensayos se utilizó el complejo  $^{64}\text{Cu}$ -His y el nivel de acumulación fue calculado a partir de la radioactividad asociada a los fibroblastos al final de los distintos tiempos de tratamiento. De los valores registrados en la **Tabla 2** se observa que a las 3 h de exposición los fibroblastos mutantes tienen un nivel significativamente menor de  $^{64}\text{Cu}$  acumulado, diferencia que se mantuvo después de 24 h de exposición. Los datos indican que si bien los fibroblastos que no expresan MT son capaces de acumular parte del Cu recién incorporado, el nivel de acumulación alcanza solo la mitad de lo que acumulan los fibroblastos silvestres.

**Tabla 2.- Contenido de  $^{64}\text{Cu}$  (pmoles/ mg proteína) en fibroblastos mutantes y silvestres expuestos a 5  $\mu\text{M}$   $^{64}\text{Cu}$ -His.**

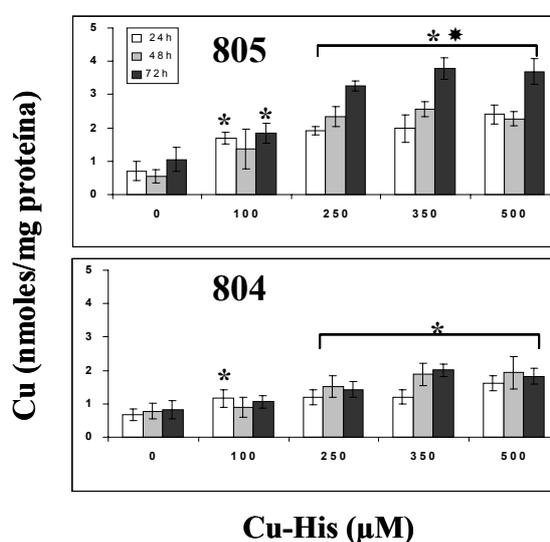
	805	804
tiempo (h)		
3	49.1 $\pm$ 3.8	21.2 $\pm$ 5.2
24	126.8 $\pm$ 13.6 (*)	54.6 $\pm$ 1.9 (*)

Cada valor corresponde al promedio de un duplicado y su DS, los que fueron analizados por una prueba de t. (\*)  $p < 0.001$

Para evaluar la tasa de acumulación a concentraciones supra-fisiológicas de Cu, fibroblastos mutantes y silvestres fueron tratados con concentraciones desde 100 a 500  $\mu\text{M}$  de Cu-His por períodos de 24 a 72 h. El contenido total de Cu fue cuantificado por espectrometría de absorción atómica (AAS) en horno de grafito. Se observó que ambas líneas celulares incrementan el contenido de Cu en respuesta a la exposición al metal, y que este aumento fue dependiente de la concentración del metal. Sin embargo, el aumento en el contenido de Cu de los fibroblastos silvestres fue significativamente mayor al medido en los fibroblastos mutantes (Figura 11).

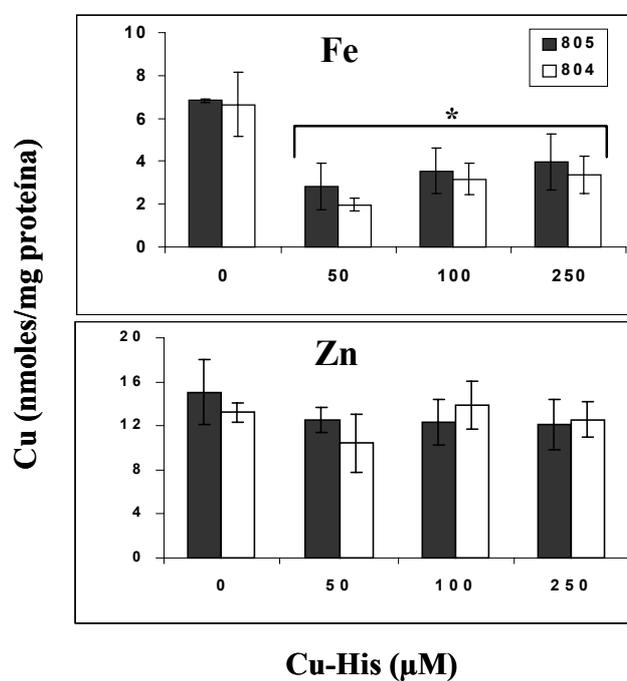
El análisis del contenido de Cu en los fibroblastos expuestos al metal indica claramente que los fibroblastos que expresan MT almacenan una mayor cantidad de Cu. Esta mayor tasa de acumulación se manifiesta tanto a concentraciones fisiológicas como supra-fisiológicas del metal.

En atención a que el metabolismo de Cu esta estrechamente relacionado con el metabolismo de Fe y Zn, se evaluó en los fibroblastos mutantes y silvestres si la exposición a Cu afecta el nivel intracelular de los otros metales traza. En ambas las líneas celulares no se detectaron cambios en el contenido de Zn (determinado por AAS en horno de llama) en ninguna de las condiciones de exposición a Cu (Figura 12). Por otra parte, la exposición por 72 h a 50  $\mu\text{M}$  de Cu-His provocó una disminución significativa en el contenido de Fe (determinado por AAS en horno de grafito) en ambas líneas celulares (Figura 12). Un aumento adicional en la concentración extracelular de Cu (de 50 a 100-250  $\mu\text{M}$ ) no incrementó la disminución en el contenido celular de Fe. Para

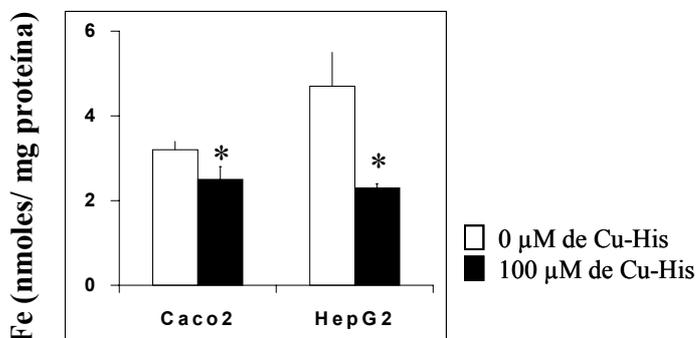


**Figura 11.- Contenido de Cu en fibroblastos expuestos a Cu-His.** Fibroblastos silvestres (805) y mutantes (804) fueron expuestos a concentraciones crecientes de Cu extracelular por 24, 48 y 72 h. El contenido de Cu en los fibroblastos fue determinado por AAS en horno de grafito y fueron normalizados por el contenido de proteínas de la muestra. Los valores graficados corresponden al promedio de un triplicado y su desviación estándar. Se les realizó una prueba estadística de ANOVA a las diferencias en el contenido de las células tratadas respecto al contenido de las células no tratadas (\*) y de su dependencia con el tiempo de exposición a Cu (\*)  $P < 0.05$

evaluar si la reducción en el contenido de Fe es un fenómeno específico de los fibroblastos, se realizaron ensayos de exposición a concentraciones supra-fisiológicas de Cu en otras dos líneas celulares (HepG2 y Caco2), las cuales han sido extensamente utilizadas para estudiar el metabolismo celular de Cu. En la **Figura 13** se muestra que en ambas líneas celulares expuestas a 100 μm de Cu-His por 48 h el contenido de Fe disminuye significativamente.



**Figura 12.- Contenido de Fe y Zn en fibroblastos expuestos a Cu.** El contenido de Fe y Zn fue cuantificado en fibroblastos silvestres (805) y mutantes (804) expuestos a concentraciones crecientes de Cu-His por 72 h. El contenido de Fe y Zn fue cuantificado por AAS y fueron normalizados por el contenido de proteínas de la muestra. Los valores graficados corresponden al promedio de un triplicado y su desviación estándar. La diferencia en el contenido de las células tratadas respecto a las células no tratadas fue analizado con una prueba de t.  $P < 0.05$  (\*).

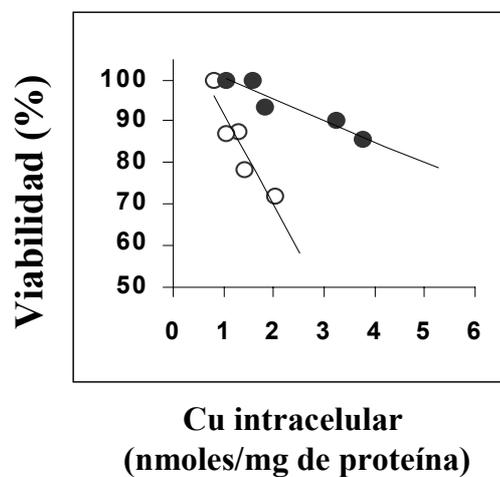


**Figura 13.-. Contenido de Fe en células Caco2 y HepG2 expuestas a Cu.** Células Caco2 y HepG2 fueron tratadas con 0 y 100  $\mu\text{M}$  de Cu-His por 48 h. Alícuotas de  $0.3 \times 10^6$  células fueron utilizadas para determinar el contenido de Fe por AAS en horno de grafito. Los valores corresponden a un triplicado y su desviación estándar. La diferencia en el contenido de las células tratadas respecto a las células no tratadas fue analizada mediante una prueba de t.  $P < 0.001$  (\*).

Estos resultados muestran que en ambas líneas celulares, durante la exposición a concentraciones supra-fisiológicas de Cu, el contenido intracelular de Cu aumenta, el contenido de Zn se mantiene y el de Fe disminuye. La principal diferencia observada entre los fibroblastos silvestres y mutantes fue el mayor aumento en el contenido celular de Cu en las células que contienen MT, sugiriendo que esta proteína incrementa la capacidad de almacenamiento del metal cuando la oferta de Cu aumenta en el medio extracelular.

**Fibroblastos mutantes son más sensibles a un menor contenido intracelular de Cu que los fibroblastos silvestres.**

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores se procedió a examinar la relación entre el contenido celular de Cu y la viabilidad celular. Para ello, en la **Figura 14** se graficó el porcentaje de células vivas (calculado a partir de los datos de reducción de MTT) *versus* el contenido celular de Cu (cuantificado por AAS) observado en fibroblastos mutantes y silvestres expuestos a concentraciones crecientes de Cu por 72 h. El análisis de este gráfico indicó que a una misma concentración de Cu intracelular existe una menor viabilidad de los fibroblastos mutantes en comparación a la línea silvestre (805), sugiriendo que la toxicidad generada por Cu no es tan solo dependiente de su concentración intracelular sino también, de las interacciones moleculares que establece el metal. En este contexto, la mayor capacidad de almacenamiento de Cu en aquellos fibroblastos que expresan MT sugiere que cuando las células son expuestas a un exceso de Cu extracelular, MT permite secuestrar el Cu en un compartimiento “seguro”.



**Figura 14.- Relación entre viabilidad celular y el contenido de Cu intracelular.** Se graficaron los valores de viabilidad celular y de contenido intracelular de Cu determinado para cada concentración de Cu extracelular utilizada en el tratamiento de fibroblastos mutantes y silvestres por 72 h. La correlación entre viabilidad y el contenido intracelular de Cu para cada línea celular se determinó mediante un análisis de Pearson encontrándose significativos con un valor de  $P < 0.001$ . A través de un análisis de varianza se determinó que las rectas observadas para ambas líneas celulares son estadísticamente diferentes con un  $p < 0.05$ .

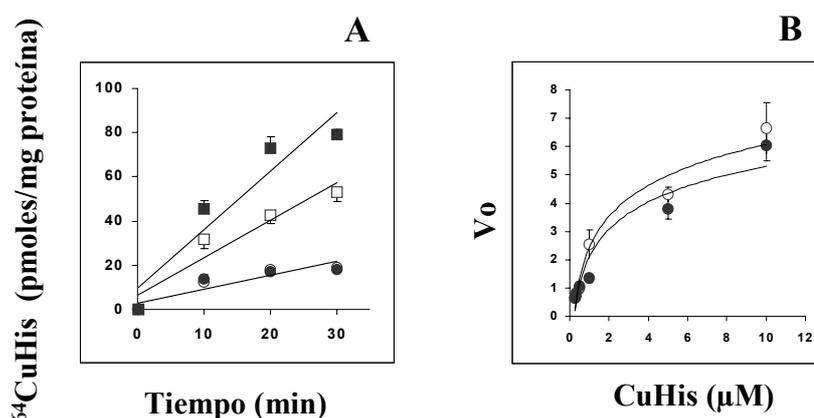
## **ANÁLISIS DE LA INCORPORACIÓN Y EXCRECIÓN DE Cu DE LOS FIBROBLASTOS EN CULTIVO.**

Las propiedades de MT más relevante para la regulación del metabolismo de Cu son la de unir el metal en forma segura y la de transferirlo a cupro-enzimas. Los resultados presentados hasta aquí señalan una correlación positiva entre la presencia de MT y una mayor capacidad de acumular Cu en los fibroblastos silvestres, sugiriendo que la capacidad de esta proteína para unir el metal podría explicar el mayor contenido de Cu durante la exposición a este metal en los fibroblastos silvestres. Sin embargo, queda abierta la posibilidad de que la ausencia de MT modifique la(s) ruta(s) de transferencia de Cu alterando la tasa de entrada o salida del metal. De esta forma la disminución en el contenido de Cu intracelular en fibroblastos mutantes puede ser el resultado de un descenso en la incorporación del metal o de un incremento en su velocidad de salida. Para evaluar esta posibilidad se determinaron los parámetros cinéticos que describen la incorporación de Cu y la tasa de salida de ambas líneas celulares expuestas a  $^{64}\text{Cu-His}$ .

### **La incorporación de Cu en los fibroblastos en cultivo no es modulada por MT.**

En primer lugar, se analizó la incorporación de Cu en fibroblastos expuestos a una concentración fisiológica de  $^{64}\text{Cu-His}$ . En la **Figura 15 A** se observa que en células expuestas a 1 y 5  $\mu\text{M}$  de  $^{64}\text{Cu-His}$  el nivel de

incorporación de Cu radiactivo fue directamente proporcional al tiempo de exposición durante los primeros 30 min. Con este resultado se estableció que 15 minutos de exposición representa un tiempo adecuado para determinar la relación entre la tasa de incorporación y la concentración de Cu extracelular. Al graficar los datos de velocidad inicial se obtuvo una curva del tipo de Michaelis-Menten, con una fase de aumento inicial dependiente de la concentración extracelular de Cu seguida de una fase con pendiente cercana a cero en la que



**Figura 15.- Dependencia del tiempo y de la concentración de Cu extracelular en la tasa de incorporación del metal.** A) Fibroblastos mutantes (símbolos blancos) y silvestres (símbolos negros) fueron expuestos a 1  $\mu\text{M}$  (círculos) ó 5  $\mu\text{M}$  (cuadrados) de  $^{64}\text{CuHis}$  por 10, 20 y 30 min. El contenido de Cu radiactivo fue determinado en un contador de centelleo y una alícuota de cada muestra fue utilizada para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. B) Los fibroblastos fueron expuestos a concentraciones crecientes de Cu extracelular por 15 min. El contenido de  $^{64}\text{Cu}$  y de proteínas fue realizado como se describió en A y se graficó la velocidad inicial de la incorporación respecto de la concentración de Cu extracelular. Los valores graficados corresponden al promedio de un triplicado y su d.s.

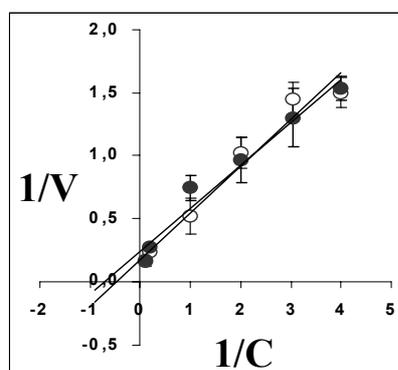
se alcanza la saturación (Figura 15 B). No se observaron diferencias obvias en las curvas de incorporación de  $^{64}\text{Cu}$  obtenidas para los fibroblastos mutantes y silvestres, por lo que se procedió a comparar los parámetros cinéticos de  $V_{\text{max}}$  y  $K_m$  aparente, calculados a partir de los datos de incorporación de ambas líneas celulares. Como se observa en un gráfico de doble recíproco (Figura 16), los valores de  $V_{\text{max}}$  y  $K_m$  aparente para los fibroblastos silvestres resultaron ser similares a los obtenidos en la línea mutante (Tabla 3). Estos resultados sugieren que la población y/o tipo de transportadores de Cu presentes en la membrana plasmática son muy similares en ambas líneas celulares.

**Tabla 3.- Parámetros cinéticos de la incorporación de Cu en los fibroblastos en cultivo.**

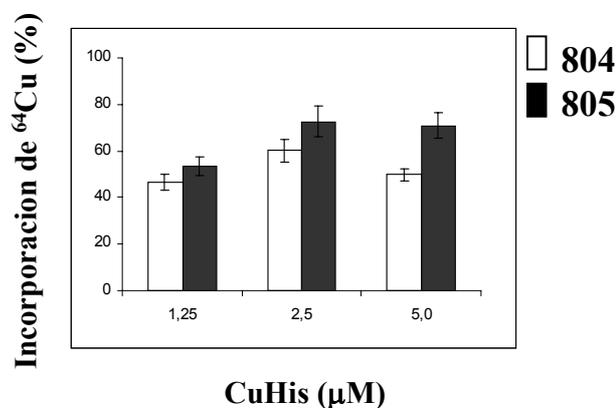
Líneas celulares	$V_{\text{max}}$ pmoles Cu/min/mg proteína	$K_m$ ap. $\mu\text{M}$
805	$4.25 \pm 0.78$	$1.46 \pm 0.33$
804	$6.22 \pm 0.38$	$2.32 \pm 0.70$

En una segunda etapa se analizó la incorporación de  $^{64}\text{Cu}$  en los fibroblastos mutantes y silvestres pre-expuestos a una concentración supra-fisiológica del metal. Para ello, fibroblastos silvestres y mutantes fueron pre-tratados con 0 y 250  $\mu\text{M}$  de Cu-His por 24 h. Una vez finalizado el tratamiento, el medio de cultivo fue sustituido por medio fresco (0,44  $\mu\text{M}$  de Cu) conteniendo

distintas concentraciones de  $^{64}\text{Cu}$ -His. Finalmente, las células fueron cosechadas y el nivel de incorporación de  $^{64}\text{Cu}$  se determinó como se indica en Materiales y Métodos. En la **Figura 17** se muestra que tanto en los fibroblastos silvestres como en los fibroblastos mutantes, la cantidad de  $^{64}\text{Cu}$  incorporado fue menor cuando las células fueron pre-tratadas con una concentración supra-fisiológica de Cu. El análisis de los valores de incorporación de  $^{64}\text{Cu}$  indica que esta disminución fue de igual magnitud para ambas líneas celulares, sugiriendo que los fibroblastos regulan la tasa de entrada de Cu cuando son expuestos a una concentración supra-fisiológica del metal y que el mecanismo de regulación no es dependiente de la presencia de MT. Por lo tanto, las diferencias observadas en el nivel de acumulación de Cu entre fibroblastos silvestres y mutantes deben reflejar una diferencia en el tráfico de salida del metal.



**Figura 16.- Gráfico de doble recíproco para la incorporación de Cu de las líneas de fibroblastos mutantes y silvestres.** Con los valores de velocidad inicial para cada concentración extracelular mostrados en la Figura anterior, se construyó un gráfico de doble recíproco. Los valores obtenidos para la línea mutante se muestran con círculos blancos y para la línea silvestre con círculos negros.



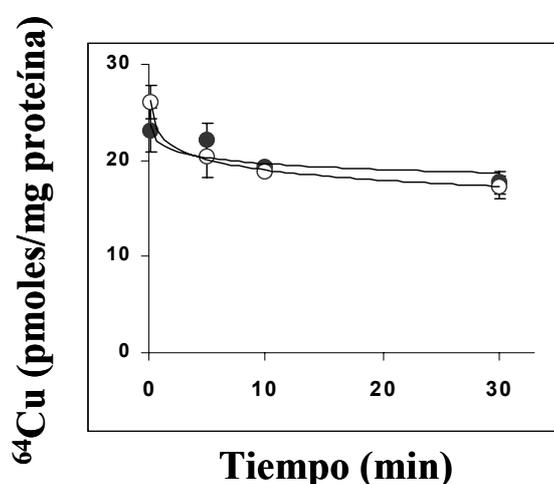
**Figura 17.- Incorporación de Cu en fibroblastos pre-expuestos a Cu extracelular.** Fibroblastos mutantes (804) y silvestres (805) fueron pre tratados con 250 μM de Cu-His por 24 h. Células pre-expuestas y control (no tratados) fueron utilizadas en un ensayo de incorporación de  $^{64}\text{Cu}$  como el descrito en la Figura 15 B. La incorporación de  $^{64}\text{Cu}$  en las células pre-tratadas es mostrada como el porcentaje respecto al valor obtenido en las células no tratadas de cada línea celular.

- La disminución en la incorporación de las células tratadas y controles fue analizada por ANOVA y encontrada significativa con un valor de  $P < 0.05$ .
- También fue significativa la diferencia en la incorporación entre líneas celulares pre tratadas.  $P < 0.05$

#### **MT no afecta la tasa de excreción de $^{64}\text{Cu}$ en los fibroblastos en cultivo.**

La excreción de Cu fue examinada mediante ensayos de pulso y caza, en los cuales los fibroblastos fueron, primero expuestos por una hora a distintas concentraciones de  $^{64}\text{Cu}$  (pulso) y luego mantenidos por diferentes tiempos en un medio libre del trazador antes de ser cosechados y de medir la radioactividad asociada (caza). En estos ensayos, la diferencia entre el contenido de  $^{64}\text{Cu}$  retenido en las células al final del periodo de exposición y el  $^{64}\text{Cu}$  que permanece asociado a las células después de los distintos tiempos de caza se utilizó para calcular el nivel de excreción del metal. En la [Figura 18](#) se

observa que las curvas generadas a partir de los valores de retención de  $^{64}\text{Cu}$  en los fibroblastos mutantes y silvestres presentan un patrón similar. En ellas se distinguen dos componentes, el primero se produce en los primeros 10 min de caza (fase de salida rápida de  $^{64}\text{Cu}$ ) y el segundo se produce a continuación y se extiende hasta el final del periodo analizado (fase de salida lenta).



**FIGURA 18.- Excreción de  $^{64}\text{Cu}$  en fibroblastos en cultivo.** Fibroblastos mutantes (804) y silvestres (805) fueron expuestos a un pulso de  $1\ \mu\text{M}$  de  $^{64}\text{Cu}$ -His por 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Luego fueron lavados con tampón fosfato (PBS) y la unión inespecífica fue desplazada con PBS/Cu-His  $10\ \mu\text{M}$  frío. Se incubaron las células con medio de cultivo a  $37\ ^\circ\text{C}$  por distintos tiempos de caza (0-30 min). El contenido de  $^{64}\text{Cu}$  fue determinado en un contador de centelleo y expresado en relación al contenido de proteínas de la muestra. Los valores graficados corresponden al promedio de un triplicado y su ds.

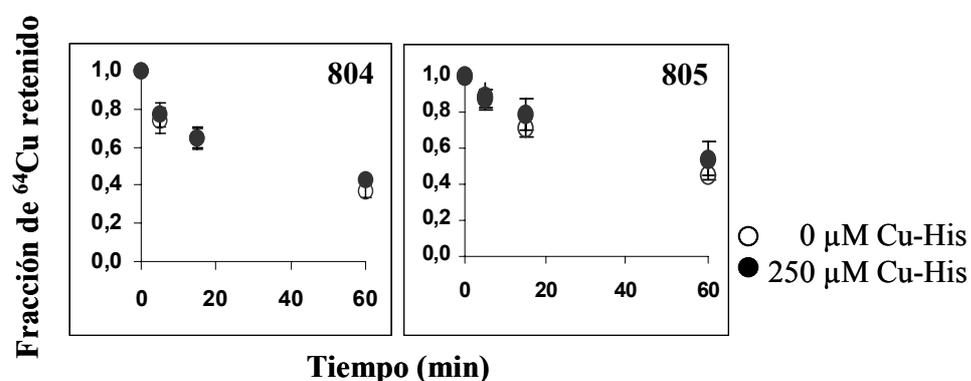
En la **figura 18** se observa que a los 30 min, los fibroblastos silvestres y mutantes retienen sobre un 65 % de la radioactividad total acumulada al tiempo 0 de caza. Este resultado sugiere que una parte importante del Cu recién

ingresado a la célula se incorpora en un compartimiento de recambio lento el cual, probablemente, está constituido por chaperonas de Cu, GSH y cuproproteínas y que, en el caso de fibroblastos silvestres, además, puede contener MT. Por tal motivo y considerando que fibroblastos silvestres y mutantes no presentan diferencias en el flujo de salida del Cu recién incorporado, es posible suponer que en los fibroblastos mutantes hay una mayor salida de Cu desde el compartimiento de recambio lento (constituido principalmente por Cu no radioactivo). De este modo, existirían al menos dos poblaciones de Cu intracelular, uno que tiene un acceso rápido a las rutas de salida y otra de recambio lento, el cual podría dar cuenta de las diferencias observadas en la tasa de acumulación de Cu entre fibroblastos silvestres y mutantes.

Al igual que con los ensayos de incorporación, se evaluó si la pre-exposición a altas concentraciones de Cu afecta la tasa de salida del metal. El análisis de los resultados indicó que la tasa de salida de  $^{64}\text{Cu}$  en los fibroblastos pre-expuestos por 24 h a 250  $\mu\text{M}$  de Cu-His no fue diferente a la tasa observada en los fibroblastos no expuestos al metal (Figura 19). Si bien ambas líneas celulares mantuvieron un nivel de retención de  $^{64}\text{Cu}$  similar al observado sin pre-exposición al metal, se observó en varios experimentos un nivel de retención levemente mayor en los fibroblastos silvestres.

En conjunto, los resultados obtenidos del análisis del tráfico celular de Cu en fibroblastos mutantes y silvestres mostraron que, ambas líneas celulares tienen una cinética similar de incorporación de Cu y que la tasa de excreción del

metal recién incorporado ( $^{64}\text{Cu}$ ) no difieren entre ambos tipos de fibroblastos. Los resultados en las células pre-tratadas a concentraciones supra-fisiológicas del metal sugieren que la ausencia de MT no afecta el mecanismo que regula la entrada de  $^{64}\text{Cu}$  y tampoco parece controlar la ruta de salida rápida de Cu en respuesta a la exposición al metal. Queda abierta la posibilidad de que MT regule la salida de la población de Cu desde el compartimiento de recambio lento. Aunque nuestros resultados indican que esta es una posibilidad que debe ser investigada, la medición de la excreción del Cu no radiactivo, vía TXRF o AAS, se ve limitada experimentalmente por la incapacidad de distinguir la disminución en el contenido del metal (< a un 10% del total del contenido) que se observa al durante su salida (ver discusión).



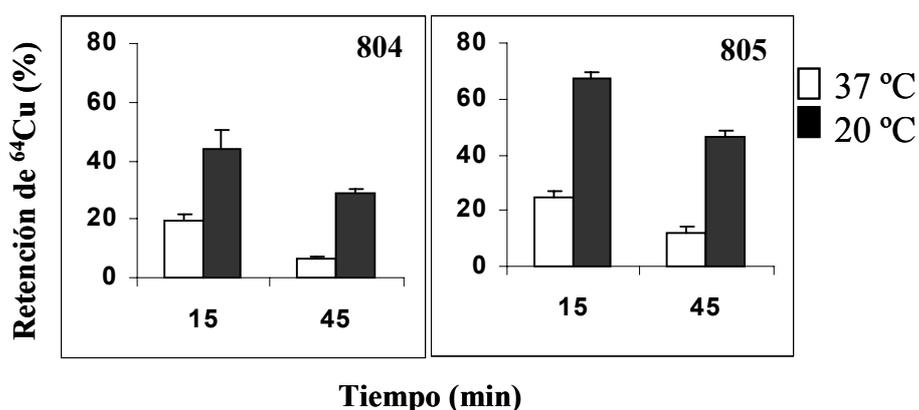
**Figura 19.-Retención de  $^{64}\text{Cu}$  en fibroblastos pre-tratados con Cu-His.** Fibroblastos silvestres (805) y mutantes (804) fueron tratados con 0 y 250  $\mu\text{M}$  de Cu-His por 24 h, luego de los cuales se determinó la retención de  $^{64}\text{Cu}$  como se explica en la figura anterior. La retención de Cu en los tiempo 5, 10 y 60 min de caza de cada línea se graficó como la fracción retenida respecto al contenido al tiempo 0 de caza.

**MT modula la ruta de excreción de Cu en los fibroblastos en cultivo.**

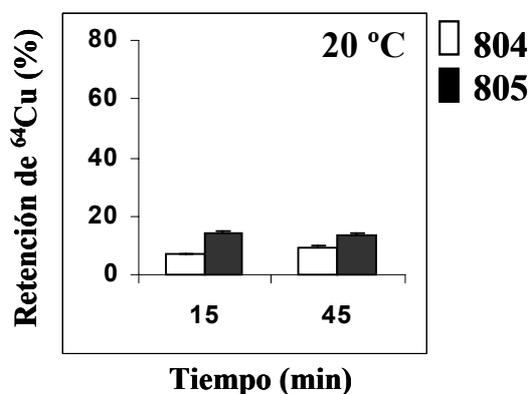
La participación de MT durante el proceso de salida del Cu fue estudiada analizando la ruta de salida del metal. Como fue mencionado, la salida del Cu es mediada por la actividad de un transportador específico para Cu, el ATP7A. En relación con este transportador, existen evidencias que sugieren que las funciones de MT y del transportador están estrechamente relacionadas. Por una parte, en células en las que se ha anulado la expresión del ATP7A, la presencia de MT es esencial para su sobre vivencia, incluso a concentraciones sub-fisiológicas de Cu. Al mismo tiempo, células que han perdido la capacidad de inducir MT por exposición a Cu, aumentan su viabilidad frente a la exposición al metal cuando se induce la expresión del ATP7A. Este transportador se localiza principalmente en la red trans del Aparato de Golgi (TGN), incorporando el Cu desde el citoplasma al lumen del organelo, para luego ser secretado a través de vesículas (ruta TGN-dependiente). Además, existen claras evidencias que, en respuesta a la exposición a concentraciones supra-fisiológicas de Cu, el ATP7A se redistribuye a la membrana plasmática, constituyendo una segunda ruta de salida en la cual el Cu es movilizado desde el citoplasma hacia el espacio extracelular (ruta MP-dependiente). Se cree que este es un mecanismo que opera a concentraciones fisiológicas de Cu inducido por las fluctuaciones intracelulares del metal, de manera que la localización del transportador podría ser dependiente del contenido intracelular de Cu. Con estos antecedentes, se diseñó una estrategia que permitiera analizar la ruta de salida del Cu desde los fibroblastos mutantes y silvestres.

Para distinguir la ruta de salida de Cu TGN-dependiente de la ruta MP-dependiente, se realizaron ensayos de retención con un pulso de  $^{64}\text{Cu}$  en fibroblastos mantenidos a 37 y a 20 °C. La temperatura a 20 °C se utilizó con el propósito de reducir el tráfico vesicular desde el TGN hacia la membrana plasmática, de manera que se produzca una acumulación de las proteínas que se exportan por esta vía. En todos los casos, los fibroblastos mutantes y silvestres fueron expuestos a un pulso de  $^{64}\text{Cu}$  a 37°C por 1 h y a 20 °C por las siguientes 2,5 h. La caza se realizó a diferentes tiempos y se determinó la salida de  $^{64}\text{Cu}$  en fibroblastos mantenidos a una temperatura de 37 ó 20 °C. La salida de Cu en los fibroblastos silvestres y mutantes fue expresada como el porcentaje de retención a los 15 y 45 min de caza, correspondiendo el 100% de retención al contenido de  $^{64}\text{Cu}$  determinado al tiempo 0 de caza. Los resultados indican que cuando la caza fue realizada a 37 °C, la retención de  $^{64}\text{Cu}$ , a los 15 min, fue de 20 y 25 % para los fibroblastos mutantes y silvestres respectivamente (Figura 20). El nivel de  $^{64}\text{Cu}$  retenido aumentó en ambas líneas celulares cuando la caza fue realizada 20 °C. De este modo, los fibroblastos mutantes aumentaron el nivel de retención hasta un 44 %, mientras que los fibroblastos silvestres aumentaron su retención hasta un 68 %. Este resultado sugiere que en los fibroblastos silvestres, la salida del  $^{64}\text{Cu}$  (recién incorporado) ocurre principalmente por la ruta TGN-dependiente y que en los fibroblastos mutantes la salida de  $^{64}\text{Cu}$  sería principalmente por la ruta MP-dependiente. Esta posibilidad implica que en condiciones fisiológicas de cultivo, los fibroblastos que carecen de MT tienen una población mayor del ATP7A

localizado en la membrana plasmática. Para evaluar que la diferencia en las rutas de salida se debe a un cambio en la localización del transportador, se estimuló su re-localización desde el TGN hacia la membrana plasmática con un pulso de 250  $\mu\text{M}$  de Cu seguido de una caza a 20  $^{\circ}\text{C}$ . En el gráfico de la **Figura 21** se observa que el nivel de retención de  $^{64}\text{Cu}$  fue menor al 20% en ambas líneas celulares, indicando que, en ambos casos, la salida del Cu recién incorporado fue independiente de la disminución de temperatura. Este resultado apoya la posibilidad de que, en presencia de MT, la principal ruta de salida de Cu es TGN-dependiente, mientras que en ausencia de MT, es MP-dependiente.

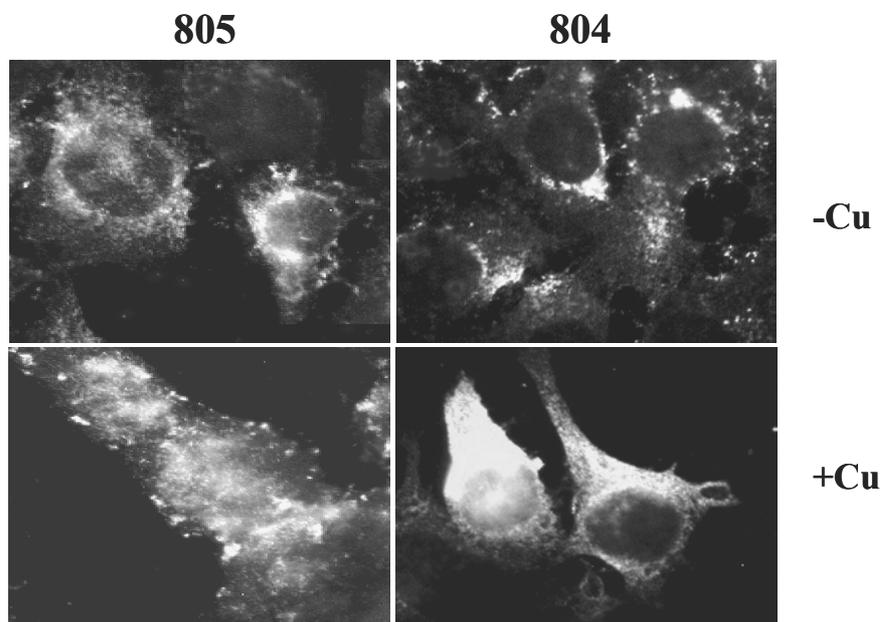


**Figura 20.- Dependencia de la temperatura en la retención de  $^{64}\text{Cu}$  en los fibroblastos expuestos a una concentración fisiológica de Cu.** Fibroblastos mutantes y silvestres fueron expuestos a un pulso de 5  $\mu\text{M}$  de  $^{64}\text{Cu}$ -His a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 1 h y a 20  $^{\circ}\text{C}$  por otras 2,5 h. La caza se realizó a 37  $^{\circ}\text{C}$  ó a 20  $^{\circ}\text{C}$  y el contenido de  $^{64}\text{Cu}$  retenido a los 15 y 45 min de caza se graficó como porcentaje respecto al contenido al tiempo 0 de caza.



**Figura 21.- Dependencia de la temperatura en la retención de  $^{64}\text{Cu}$  en los fibroblastos expuestos a una concentración supra-fisiológica de Cu.** Fibroblastos mutantes y silvestres fueron expuestos a un pulso de  $250\ \mu\text{M}$  de  $^{64}\text{Cu}$ -His a  $37\ ^\circ\text{C}$  por 1 h y a  $20\ ^\circ\text{C}$  por otras 2,5 h. La caza se realizó a  $20\ ^\circ\text{C}$  y el contenido de  $^{64}\text{Cu}$  retenido a los 15 y 45 min de caza se graficó como porcentaje respecto al contenido al tiempo 0 de caza.

En forma complementaria se examinó la distribución celular del transportador ATP7A en fibroblastos mutantes y silvestres utilizando un anticuerpo policlonal anti-ATP7A en ensayos de inmunofluorescencia indirecta. El análisis se centró principalmente en células mantenidas por 3 h en un medio sin suplemento de Cu o expuestos a  $250\ \mu\text{M}$  de Cu-His. En ambas líneas celulares mantenidas a una concentración sub-fisiológicas de Cu ( $0.44\ \mu\text{M}$ ), se observó que ATP7A se distribuía en el citosol en forma punteada con una intensa marca perinuclear que disminuye hacia la periferia de la célula, presentando además una marca difusa en el núcleo (Figura 22). Al exponer los fibroblastos a una concentración supra-fisiológica de Cu ( $250\ \mu\text{M}$ ) se observó

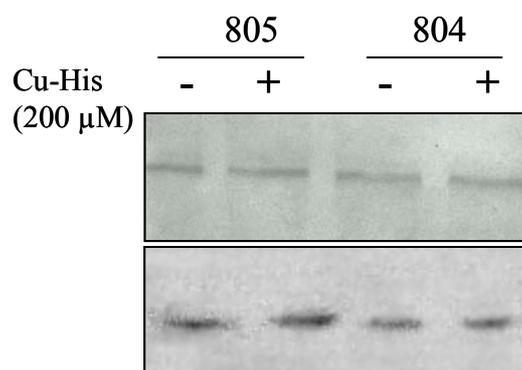


**Figura 22.- Localización del transportador ATP7A en fibroblastos mutantes y silvestres.** Fibroblastos silvestres (805) y mutantes (804) fueron expuestos a 0 (-Cu) o 200  $\mu$ M (+Cu) de Cu-His por 3 h. Las células fueron fijadas en paraformaldehído 4 % y permeabilizadas en PBS tritón X-100 0.1 %. La localización del transportador fue visualizada mediante el uso de un anticuerpo policlonal anti-ATP7A y un segundo anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado a fluoresceína. Las células fueron observadas bajo microscopía de fluorescencia.

que la marca se distribuía en forma homogénea desde la periferia de la célula hasta el núcleo disminuyendo la intensidad observada en la región perinuclear. Este estudio indica que la exposición a Cu altera el patrón de distribución del ATP7A, el cual no fue asociado a un cambio en la distribución de otros componentes celulares tales como, actina y N-Caderina, proteínas del

citoesqueleto y de la matriz extracelular respectivamente (dato no mostrado). Además, se evaluó si el cambio de la distribución celular del transportador se correlaciona con una modificación en el nivel de abundancia de esta proteína. Para ello, las proteínas presentes en los extractos celulares obtenidos de fibroblastos mutantes y silvestres tratados por 3 h con 5 ó 250  $\mu\text{M}$  de Cu-His fueron fraccionadas en geles de poliacrilamida, y analizadas por ensayos de Western blots con un anticuerpo policlonal anti-ATP7A (Figura 23). En los 4 extractos celulares se observó una banda inmunoreactiva con el anticuerpo anti-ATP7A, la que migró con un peso molecular similar al descrito para esta proteína (180 kDa). La expresión de actina fue utilizada como un control de carga para normalizar la abundancia relativa del transportador en las diferentes muestras (Figura 23). Luego de cuantificar la intensidad de la señal asociada con cada banda inmunoreactiva, unidades densitométricas relativas fueron usadas para determinar la razón ATP7A/actina. El resultado del análisis indica que, tanto los fibroblastos mutantes como los silvestres, expresan el ATP7A, y que su nivel de expresión no cambia en respuesta a la exposición a una concentración supra-fisiológica del metal. Para estimar en forma directa la población de ATP7A en la membrana plasmática, se realizó un ensayo de biotinilación. En este ensayo, las proteínas presentes en la superficie celular de los fibroblastos fueron marcadas con biotina, precipitadas selectivamente con la unión del complejo streptoavidina-Proteína A y luego fraccionadas en geles de poliacrilamida y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. La

inmunomarcación con el anticuerpo anti-ATP7A de las proteínas no mostró bandas inmunoreactivas en ninguna de las líneas celulares.



**Figura 23.- Expresión de la proteína ATP7A en los fibroblastos expuestos a 0 y 250  $\mu$ M de Cu-His.** Fibroblastos mutantes (804) y silvestres (805) fueron expuestos a 0 (-) y 250  $\mu$ M (+) de Cu-His por 3 h a 37 °C. Luego fueron hidrolizados en un tampón Tris-HCl 0.1 M con SDS al 2%. Una alícuota de los homogenizados fue utilizada para cuantificar proteínas mediante el ensayo de Bradford. 30  $\mu$ g de cada muestra se cargaron en un gel SDS-PAGE al 7,5 % y luego de corrido, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. La mitad superior de la membrana fue tratada con un anticuerpo policlonal anti-ATP7A y la parte inferior con un anticuerpo policlonal anti-actina. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas mediante quimioluminiscencia (ECL).

Alternativamente, se analizó la presencia del ATP7A en la membrana plasmática de células vivas (no fijadas ni permeabilizadas) mediante la técnica de citometría de flujo. En este ensayo, tampoco fue posible visualizar la población de transportadores presentes en la membrana plasmática. Posibles

explicaciones que den cuenta de estos resultados se discuten en la sección de Discusión.

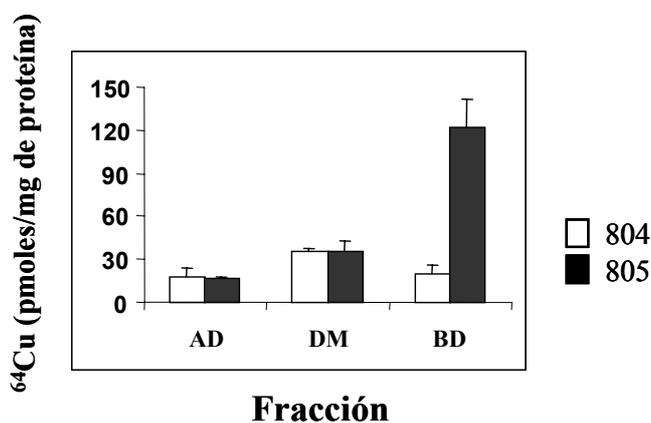
En conjunto los resultados del análisis de la ruta de salida del Cu recién incorporado sugieren que, en condiciones fisiológicas, en ambas líneas celulares existe una población activa del transportador en la membrana plasmática. Sin embargo, los ensayos de excreción de  $^{64}\text{Cu}$  a 20 °C, sugieren que la salida de Cu por una ruta TGN-dependiente es menor en los fibroblastos mutantes, sugiriendo que éstos podrían tener una población mayor de transportadores localizados en la membrana plasmática. Los resultados obtenidos en fibroblastos expuestos a concentraciones supra-fisiológicas del metal sugieren que la distribución de los elementos responsables de la salida de Cu puede ser modificada. Esta modificación puede ser interpretada como un incremento en el número de transportadores ATP7A en la membrana plasmática, los que al re localizarse aumentan la proporción de Cu que es excretado por una ruta MP-dependiente. Nuestros datos indican que este cambio se da en mayor grado en los fibroblastos que expresan MT. De esta forma, el contenido de Cu en los fibroblastos silvestres, aunque es mayor que en los fibroblastos mutantes, estaría en una configuración segura, permitiendo a las células aumentar su capacidad de almacenamiento sin que se activen otros mecanismos de regulación, tales como la re-localización del transportador de salida de Cu.

## **ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE Cu EN LOS FIBROBLASTOS EN CULTIVO.**

Tomando en cuenta que la distribución de MT es principalmente citoplasmática, y que el Cu se puede distribuir tanto en el citoplasma como en organelos (golgi, núcleo y lisosomas), se evaluó la distribución subcelular del Cu que se acumula luego de 3 ó 24 h de exposición a concentraciones fisiológicas del metal ( $5 \mu\text{M } ^{64}\text{Cu-His}$ ). En estos experimentos, los fibroblastos mutantes y silvestres fueron sometidos a un protocolo de fraccionamiento por centrifugación diferencial, el cual tiene como propósito separar el contenido celular en fracciones enriquecidas de moléculas con densidad similar con la menor contaminación posible (como se indica en Materiales y Métodos). La primera fracción corresponde a la pella generada por la centrifugación de los homogeneizados celulares a baja velocidad ( $800 \times g$  por 5 min), la que contiene estructuras de alta densidad (AD), entre las que se encuentran núcleos y células que no se rompieron durante la homogenización. Este primer sobrenadante fue centrifugado a alta velocidad ( $100.000 \times g$  por 1 h) para generar una pella que contiene elementos de densidad media (DM), compuesta por organelos, membrana plasmática y vesículas entre otros, y un sobrenadante que contiene elementos de baja densidad (BD) compuesto principalmente por componentes solubles del citoplasma.

El análisis de la distribución de  $^{64}\text{Cu}$  en estas 3 fracciones mostró que la diferencia más significativa en el contenido de Cu se obtuvo en la fracción BD,

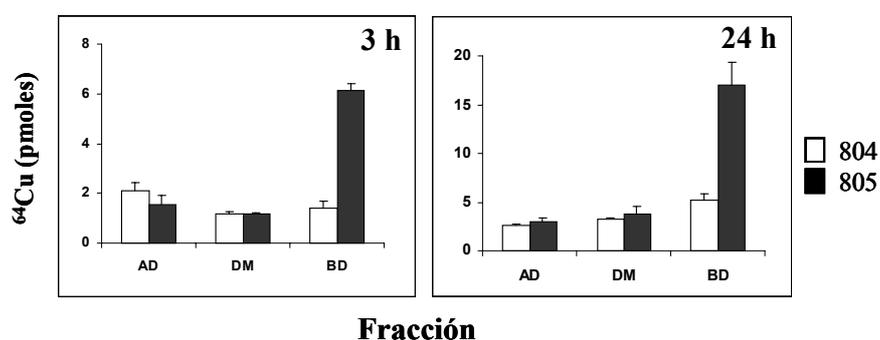
en la cual los fibroblastos silvestres presentaron un contenido de Cu por mg de proteína 6 veces mayor que el medido en las células que no expresan MT (Figura 24). En relación con las fracciones AD y DM, estas contenían niveles similares del metal en ambas líneas celulares. Este resultado muestra que la diferencia en el contenido de  $^{64}\text{Cu}$  acumulado en los fibroblastos silvestres y mutantes mostrados en la Tabla 2, se encuentra principalmente asociado a componentes presentes en la fracción de baja densidad.



**Figura 24.- Distribución subcelular del Cu recién incorporado.** El contenido de Cu en las fracciones de alta densidad (AD), densidad media (DM) y baja densidad (DB) fue determinado en fibroblastos mutantes (804) y silvestres (805) tratados con  $5\ \mu\text{M}$  de  $^{64}\text{Cu}$ -His por 3 h. Dichas fracciones fueron obtenidas mediante una centrifugación diferencial de los homogenizados como se menciona en la sec. “Materiales y Métodos”. El contenido de cada fracción fue normalizado por el contenido de proteínas.  $n=3$ .

Para analizar la distribución real del metal en cada fracción y, considerando que las dos líneas celulares presentaron una distribución similar de proteínas, se graficó el contenido de Cu en pmoles. Al graficar de esta forma

los niveles de Cu, se observó que la principal diferencia entre fibroblastos mutantes y silvestres es el mayor contenido del Cu recién incorporado en la fracción de baja densidad, siendo ésta 4,4 veces mayor que en las células silvestres (Figura 25 A). Cuando el análisis del contenido se realizó en fibroblastos mutantes y silvestres expuestos por 24 h a la misma concentración de Cu (5  $\mu$ M), se observó el mismo patrón de distribución del  $^{64}\text{Cu}$  acumulado (Figura 25 B). Este resultado sugiere que el mayor contenido de  $^{64}\text{Cu}$  en la fracción BD no constituye un lugar de acumulación transitorio del Cu sino que posiblemente representa un compartimiento en el cual se almacena una parte importante del metal que ingresa a la célula.



**Figura 25.- Distribución subcelular del Cu recién incorporado (en pmoles totales).** Fibroblastos silvestres (805) y mutantes (804) fueron mantenidos a 5  $\mu$ M de  $^{64}\text{Cu}$ -His por 3 y 24 h. El contenido total de  $^{64}\text{Cu}$  contenido en las tres fracciones obtenidas mediante una centrifugación diferencial de los homogenizados fue cuantificado como se menciona en la figura anterior. n=3.

En atención a que las evidencias indican que no existe Cu libre en la célula, es posible sugerir que el contenido de Cu observado en la fracción

citoplasmática se encuentre unido a las proteínas que lo utilizan y/o a las que lo manejan. Entre todas ellas, MT representa el principal candidato para ser el lugar de acumulación del Cu recién incorporado (ver en sec. Discusión).

Al tratar las células con una concentración supra-fisiológica de  $^{64}\text{Cu}$  (200  $\mu\text{M}$ ) por 3 y 24 h se observó que el contenido de  $^{64}\text{Cu}$  aumenta en las tres fracciones en ambas líneas celulares (Tabla 4). El mayor contenido de  $^{64}\text{Cu}$  se determinó en la fracción de alta densidad lo cual puede estar relacionado con la toxicidad asociada a la exposición a un exceso del metal.

**Tabla 4.- Distribución Subcelular del Cu medido en pmoles totales acumulado en fibroblastos tratados con 200  $\mu\text{M}$  de  $^{64}\text{Cu}$ -His por 3 y 24 h.**

Fracción	804		805	
	3 h	24 h	3 h	24 h
Alta D (800 x g)	12.6 $\pm$ 3.1	22.6 $\pm$ 0.7	8.7 $\pm$ 1.4	30.0 $\pm$ 3.1
D Media (105.000 x g)	4.7 $\pm$ 1.5	13.0 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 0.6	18.2 $\pm$ 3.9
Baja D (105.000 x g)	3.7 $\pm$ 2.5	13.7 $\pm$ 2.1	8.3 $\pm$ 0.2	19.4 $\pm$ 2.6

## **REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MT Y OTROS GENES ASOCIADOS AL METABOLISMO DE Cu EN FIBROBLASTOS SILVESTRES Y MUTANTES.**

Un aspecto que fue considerado necesario incluir en el estudio de la función de MT, fue el análisis de la participación de esta proteína en los cambios de expresión génica de MT. El análisis de la regulación génica de MT en los fibroblastos mutantes es posible, ya que esta línea es capaz de transcribir el gen de MT (Figura 4). En este contexto, se evaluaron, además, el nivel de expresión de otros genes que codifican para proteínas asociadas al metabolismo de Cu.

### **En ausencia de MT, se pierde la inducción de MT en respuesta a la exposición a Cu.**

El análisis de los cambios de expresión génica fue realizado mediante ensayos de macroarreglos en los cuales se examinó la expresión de diversos genes listados en la [Tabla 5](#). Ellos corresponden a 1) genes que codifican para proteínas relacionadas con la utilización, el almacenamiento y el tráfico celular de Cu, 2) genes que codifican para proteínas de expresión constitutiva y 3) genes que codifican para proteínas heterólogas no relacionadas con el metabolismo celular de Cu. Cantidades conocidas del cDNA de estos genes fueron sembradas en cuadruplicado y en dos concentraciones en una membrana de nylon.

**Tabla 5.- Lista de genes y de su función propuesta utilizados en la construcción del Macroarreglo.**

Nombre del Gen	Descripción
<b>Metabolismo de Cu</b>	
Atox1	Chaperona de ATP7A
Ccs1	Chaperona de SOD1
SOD1 (b)	Enz. Dismutadora de aniones superóxido
SOD1	Enz. Dismutadora de aniones superóxido
App	Proteína de membrana que reduce Cu
Wilson (b)	Transportador de Cu en células hepáticas
MNK (b)	Transportador de Cu en células no-hepáticas
MNK (a)	Transportador de Cu en células no-hepáticas
MT en pcDNA3.1	Metalotioneína en vector de clonamiento
Wilson (a)	Transportador de Cu en células hepáticas
MT1 (b)	Metalotioneína
PRPC8	Prion, proteína de membrana que une Cu
<b>Genes de expresión constitutiva y controles de unión inespecífica</b>	
GDPH	Glicerina 3-fosfato deshidrogenasa
Tubulina	Proteína de citoesqueleto
pGEM-T	Vector de clonamiento en bacterias
dH2O	agua destilada
<b>Genes heterólogos</b>	
D-Rap	gen de <i>D. melanogaster</i>

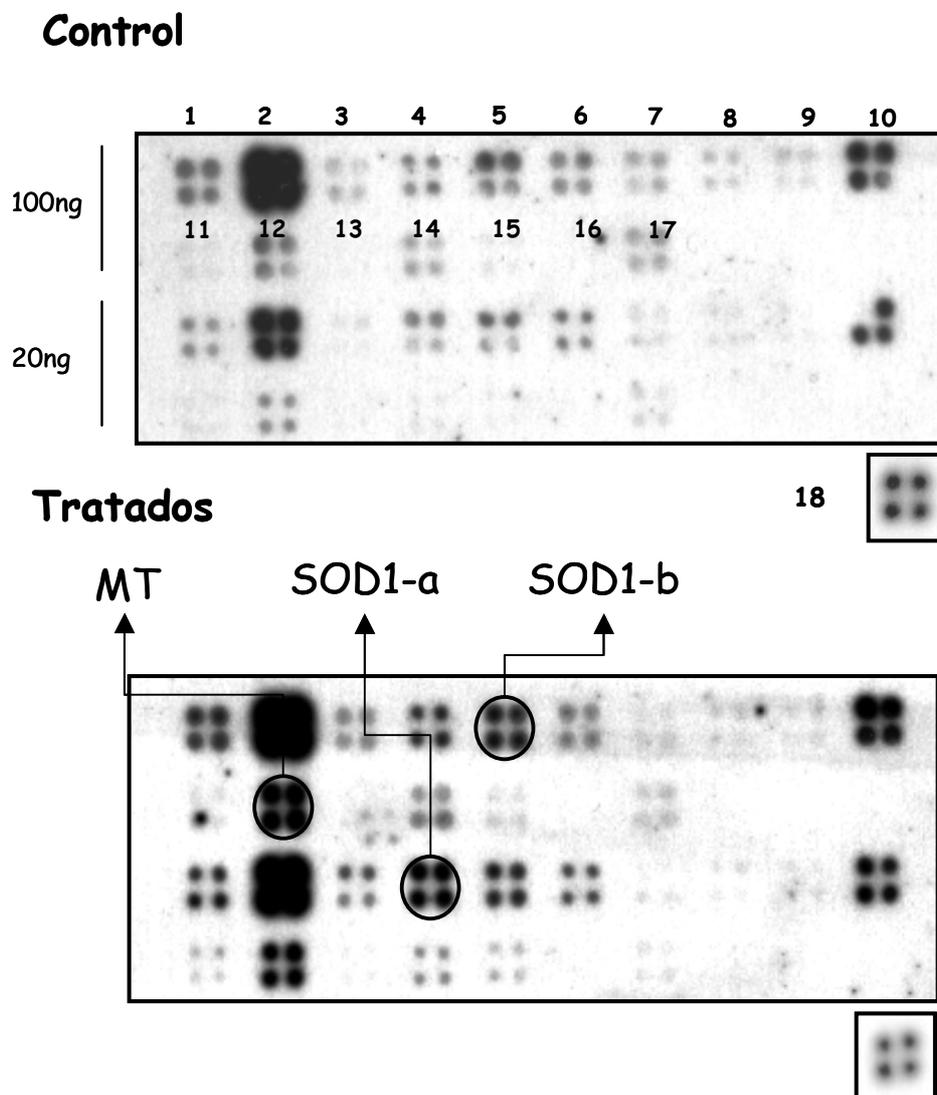
(a) y (b) denotan secuencias del gen que tienen una alta o baja homología con las secuencias de otros genes utilizados en el macroarreglo.

Se extrajo RNA total de cultivos de fibroblastos mutantes y silvestres mantenidos por 24 h a una concentración sub- o supra-fisiológica de Cu (0.44 y 100  $\mu$ M de Cu-His, respectivamente). A Partir del RNA total se produjo una población de cDNAs marcados con  $^{33}\text{P}$  los que fueron utilizados para hibridar

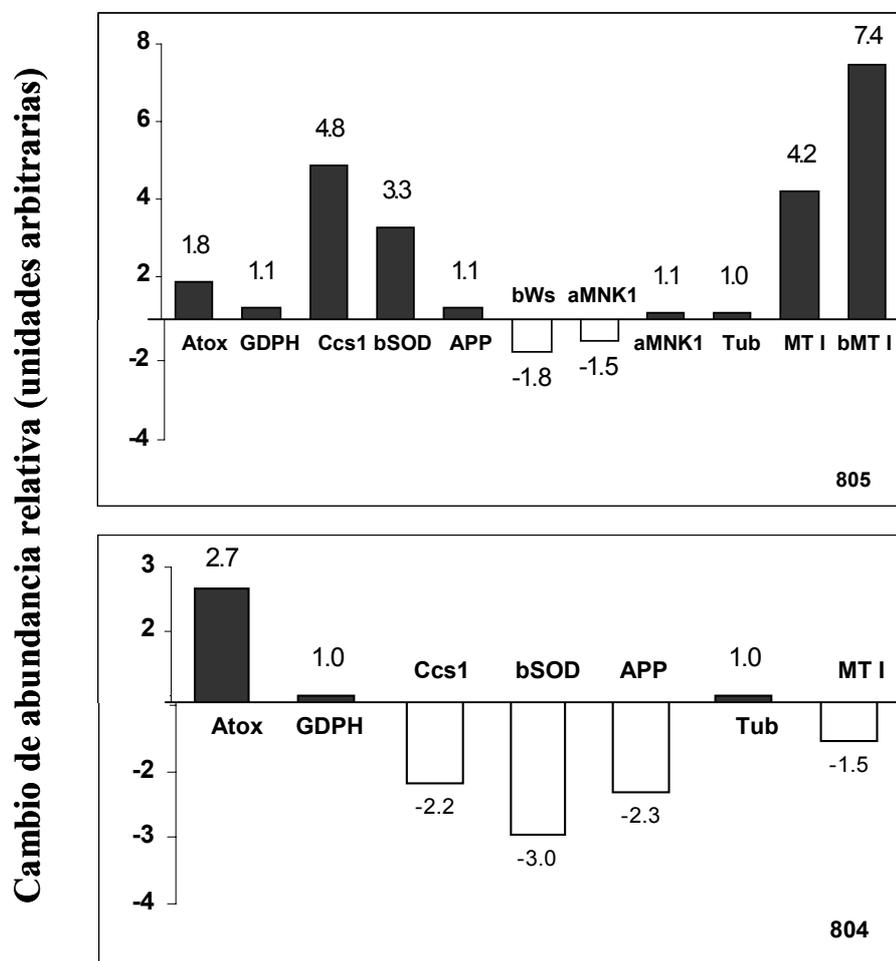
los cDNAs sembrados en el macroarreglo como se especifica en Materiales y Métodos. En la **Figura 26**, se muestra la imagen obtenida de la hibridación de los fibroblastos silvestres, tratados y no tratados con Cu. En ella, se señalan algunos genes cuyo nivel de intensidad cambia con el tratamiento, la cual fue cuantificada por densitometría. Los valores de intensidad correspondientes a los genes de interés fueron corregidos restando el ruido (señal inespecífica) y luego normalizados por la intensidad de la señal de un gen constitutivo, en este caso del gen que codifica para tubulina.

En los fibroblastos silvestres se observó un aumento en la expresión de los genes que codifican para MT, SOD1, Ccs1 y Atox1 en respuesta a la exposición a Cu. Mientras que en los fibroblastos mutantes, se observó un aumento en la expresión del gen que codifica para Atox1 y se observó una disminución en la expresión de SOD1, Ccs1 y App (**Figura 27**). Estos resultados indican que, en los fibroblastos silvestres, la exposición a Cu indujo la expresión de genes relacionados con el manejo (almacenamiento y utilización) del Cu intracelular, especialmente de MT. Por el contrario, las células que no expresan la proteína de MT, tienen una respuesta alterada frente a la inducción de la expresión de genes relacionados con el metabolismo celular de Cu. Es especialmente interesante, que el gen de MT I no fue inducido por la exposición a Cu.

En conjunto, estos datos sugieren que la proteína de MT podría ser parte del mecanismo que regula la actividad transcripcional de los genes involucrados en el metabolismo de Cu durante la exposición al metal.



**Figura 26.- Patrón de expresión de genes relacionados con el metabolismo celular de Cu.** La población de transcritos provenientes de fibroblastos silvestres tratados con 0 (control) ó 100  $\mu$ M (tratados) de Cu por 24 h fue marcada con  $^{33}$ P y utilizada para hibridar membranas conteniendo secuencias de DNA correspondientes a genes del metabolismo celular de Cu, genes de transcripción constitutiva y genes de *D. melanogaster*. Los cambios de intensidad más sobresalientes son indicados por círculos.



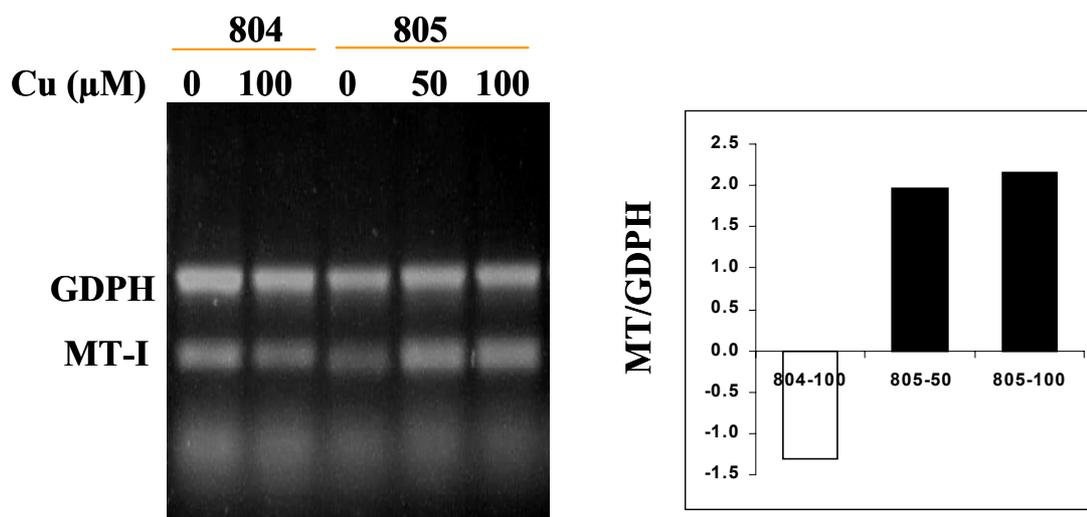
**Figura 27.- Cambio en la expresión de genes relacionados con el metabolismo celular de Cu en fibroblastos expuestos a una concentración supra-fisiológica del metal.** La hibridación de los genes utilizados en el macroarreglo (ver Figura 26) inducidos por la exposición a 100  $\mu$ M de Cu-His por 24 h fue cuantificada por densitometría. La intensidad obtenida para cada gen fue normalizada por la intensidad del gen de tubulina (gen de expresión constitutiva) y se graficó el cambio relativo de la expresión de genes de las muestras expuestas a Cu respecto a las control (no tratadas a Cu).

**La expresión del mRNA de la isoforma I de MT no se induce por la exposición a una concentración supra-fisiológica de Cu en los fibroblastos mutantes.**

Para evaluar esta hipótesis realizamos un ensayo de RT-PCR Semi-cuantitativo, con el cual se amplificaron simultáneamente los genes de la isoforma I de MT y de GDPH mediante el uso de partidores específicos para ellos. Para este ensayo se utilizaron muestras de cDNA obtenidos a partir de la extracción de RNA total de fibroblastos mutantes y silvestres tratados a concentraciones sub- y supra-fisiológicas de Cu (0.44, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de Cu-His por 24 h). En la **Figura 28** se muestra una fotografía de los productos de PCR separados en un gel de agarosa al 1,2 %. La abundancia relativa del transcrito de MT fue determinada a partir de las razones de intensidad obtenidas para los productos de amplificación de MT y GDPH. De esta forma, se determinó que en los fibroblastos silvestres la exposición a una concentración supra-fisiológica de Cu (50 y 100  $\mu\text{M}$ ) aumenta en más de dos veces la cantidad de mensajero para MT I, mientras que en los fibroblastos mutantes, la expresión de este gen disminuye 1,5 veces. Este resultado es consistente con el encontrado mediante los ensayos de hibridación en Macroarreglos de cDNA.

Estos resultados indican que en respuesta a la exposición a una concentración supra-fisiológica de Cu, las células aumentan la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con el metabolismo de Cu, entre ellas, MT. Es así, que la falta de inducción observada en los fibroblastos

mutantes sugiere que la presencia de MT es necesaria para activar su expresión, y la de otros genes como SOD, Ccs1, y APP.



**Figura 28.- Inducción de la expresión del RNAm de MT I por Cu.** Igual cantidad de RNA total de fibroblastos mutantes (804) y silvestres (805) expuestos a 0, 50 y 100  $\mu$ M de Cu-His por 48 h fue utilizado para la amplificación simultánea de los transcritos de los genes de MT I y GDPH por PCR Semicuantitativo. En la figura se muestra un gel representativo de los resultados mediante esta técnica que muestra los transcritos amplificados de ambos genes para cada muestra. A la derecha de la figura se grafica el cambio relativo de la razón MT/GDPH de los fibroblastos expuestos a Cu respecto a los fibroblastos no tratados.

## DISCUSION

Las metalotioneínas fueron descritas hace medio siglo. Desde sus comienzos, esta proteína fue relacionada con la detoxificación de metales como Cd ([Hamer, 1986](#)). Esta asociación se basa en el hecho que el contenido celular de Cd se encuentra mayoritariamente unido a MT ([Margoshes y Valle, 1957](#)). Posteriormente, se observó que la exposición a Cd induce la expresión de MT ([Cherian, 1994](#), [Linder, 2002](#)) y que un aumento en el nivel de MT incrementa la resistencia a la exposición a metales pesados ([Liu y cols, 2000](#)). Sin embargo, su función biológica como detoxificador de metales es cuestionada, dado que los casos de intoxicación por Cd son escasos y casi siempre son causados por el hombre ([Palmiter, 1998](#)). Por otro lado, fisiológicamente MT une a Zn y Cu, los cuales a diferencia de Cd son esenciales para la vida. De esta manera, la capacidad detoxificadora de MT ha sido explicada como una consecuencia de sus propiedades estructurales y no como una función evolutiva.

Considerando que MT es una proteína altamente conservada, de distribución ubicua y cuya expresión se induce en respuesta a la exposición a diferentes metales, es difícil entender porque hasta ahora no se ha podido definir que ventaja selectiva confiere a los organismos que la poseen. El desarrollo de esta tesis doctoral se basa en la idea de que la función de MT es regular el metabolismo de Cu y Zn a fin de mantener la homeostasis intracelular

de estos metales traza. En este contexto la hipótesis del proyecto de tesis fue que la función de MT es mantener la homeostasis celular de Cu a través de sus propiedades de unión del metal. Para su análisis, se aprovechó la ventaja de la existencia de un modelo celular que no expresa MT I/II el cual permitió realizar un estudio comparado de los procesos de tráfico (entrada y salida del metal), de almacenamiento y de su utilización (incorporación a cupro-enzimas), con una línea celular silvestre.

#### **MT, contenido de Cu y viabilidad celular.**

Los datos indican que en ausencia de MT, no se observan diferencias en la tasa de crecimiento ni en la viabilidad entre los fibroblastos mutantes y silvestres mantenidos en condiciones basales de cultivo ( $0,44 \mu\text{M Cu}$ ). Estos resultados confirman datos obtenidos en forma independiente por dos grupos de investigadores quienes generaron hace menos de una década, cepas de ratones que no expresan las isoformas I y II de MT. En ambos casos, los ratones crecieron y se reprodujeron normalmente cuando fueron alimentados con dietas sin un suplemento de Cu, sugiriendo que la presencia de MT no es esencial para el desarrollo y la reproducción de estos animales ([Masters y cols, 1994](#), [Michalska y Choo, 1993](#)). Por otra parte, células crecidas en un medio de cultivo sin suplemento de Cu (S49, W7 y BHK) cuya expresión de MT ha sido inhibida por metilación del DNA presentan un patrón de proliferación normal ([Master y cols, 1994b](#)). Esto también se observa en los fibroblastos provenientes de embriones que no expresan MT en los cuales la tasa de

crecimiento no se diferencia de la de los fibroblastos silvestres (Zhu y Melera, 2001). Durante el desarrollo de esta tesis se determinó que la concentración de Cu, Fe y Zn en el medio DMEM 10% SBF utilizado en el cultivo de las líneas de fibroblastos está por debajo de la concentración plasmática (ver Tabla 1). El contenido de Cu en el plasma es de 15 a 20  $\mu\text{M}$ , del cual un 60-90% está asociado a ceruloplasmina (Linder y Hazegh-Azam, 1996). La disponibilidad del Cu unido a ceruloplasmina es baja debido a que la vida media del Cu unido a esta proteína es similar a la vida media de la ceruloplasmina (Meyer y cols, 2001). Por tal motivo, se considera que el Cu bio-disponible es el Cu-noCp (unido a albúmina o aminoácidos como Histidina o Glicina), el que se calcula alcanza una concentración plasmática de 1,5 y 5  $\mu\text{M}$  (Brown y cols, 1997). Dado que el contenido de Cu en el medio de cultivo es de 0.44  $\mu\text{M}$ , esto correspondería a una concentración sub-fisiológica respecto al nivel plasmático del metal (Tapia y cols, 2002). En estas condiciones, los fibroblastos mutantes (MT<sup>-/-</sup>) y silvestres utilizados en esta tesis, tienen igual tasa de crecimiento, lo que sugiere que el contenido celular de metales traza es suficiente para cumplir con los requerimientos que demanda la síntesis de metalo-proteínas. Considerando que ambas líneas celulares presentan igual contenido de Cu (ver Figura 8) es posible sugerir que cupro-enzimas, chaperonas de Cu y GSH definen el contenido intracelular del metal y que, en los fibroblastos silvestres, MT no confiere una mayor capacidad de almacenar Cu. En particular GSH, el principal elemento no proteico involucrado en la unión del Cu intracelular podría unir y destinar el Cu recién incorporado (Da Costa Ferreira y cols, 1993, Mohan

y cols, 1995; Dijkstra y cols, 1996, Gunes y cols, 1998) en ausencia de MT. En estudios en hepatocitos se ha descrito que GSH une el Cu entrante aun antes que MT (Freedman y cols, 1989). De esta manera, en ausencia de MT, GSH podría donar el Cu directamente a las cupro-proteínas que lo requieren. Estudios *in vitro* muestran que GSH puede ser un mediador efectivo en la transferencia de Cu a la SOD1 (Ciriolo y cols, 1990, Rae y cols, 1999). Además del GSH, existe un conjunto de chaperonas que distribuyen el Cu a las cupro-enzimas durante su síntesis (Harrison y cols, 2000) las que junto a GSH pueden contribuir a formar una población de almacenamiento de Cu. Estos antecedentes, sumados a nuestros resultados, permiten sugerir que en fibroblastos expuestos a una concentración sub-fisiológica de Cu, la función de MT no es esencial, probablemente debido a que los otros componentes de la maquinaria involucrada en el metabolismo de Cu suplen la capacidad de unir y transferir el metal.

Sin embargo, nuestros resultados indican que fibroblastos expuestos a una concentración fisiológica de Cu, tuvieron un mayor contenido de Cu cuando MT esta presente. Un resultado similar ha sido observado en ratones MT (-/-) alimentados con una dieta normal, estos ratones acumulan una menor cantidad de Zn que los ratones silvestres en el tejido hepático (Kelly y Palmiter, 1996). Esto sugiere que, cuando la disponibilidad de estos metales aumenta a niveles fisiológicos, la presencia de MT se correlaciona con un aumento en la capacidad de almacenamiento de metales como Cu y Zn, posiblemente como un mecanismo para evitar el déficit. En este sentido, ratones MT (-/-) mostraron

ser más sensibles a una dieta deficiente en Zn que los ratones silvestres, lo que se ve reflejado especialmente durante el desarrollo intrauterino y en los primeros días de vida de las crías (Kelly y cols, 1996).

Los resultados del fraccionamiento sub-celular del Cu recién incorporado ( $^{64}\text{Cu}$ ) obtenidos en los fibroblastos expuestos a  $5\ \mu\text{M}$  por 3 h muestran que el mayor contenido de Cu encontrado en los fibroblastos silvestres está localizado en la fracción soluble (de baja densidad). Esta fracción correspondiente al citosol, contuvo el 70% de los pmoles totales de  $^{64}\text{Cu}$  acumulados por los fibroblastos silvestres, mientras que en los fibroblastos MT (-/-) sólo alcanzó al 30 % (Figura 25). Esta distribución diferencial se mantuvo en los fibroblastos mantenidos por 24 h a igual concentración de Cu. Un mayor contenido de Cu en la fracción citosólica ha sido previamente observado en hepatocitos tratados con concentraciones fisiológicas de Cu donde el 40% del  $^{64}\text{Cu}$  que ingresa luego de 0,5 min de exposición a  $10\ \mu\text{M}$  Cu-His es contenido en el citosol (Schmitt y cols, 1983). Una proporción equivalente de Cu en esta fracción (62-66 %) ha sido observado en el tejido hepático de ratas en las que se induce la expresión de MT (Saito y Kojima, 1997) y en las líneas celulares Huh7 (Schilsky y cols, 1998) y HepG2 (Tapia y cols, 2002) pre-expuestas a Cu, las cuales contenían un 70 y 60 % del contenido incorporado de  $^{64}\text{Cu}$  y total respectivamente. Por otro lado, la MT es una proteína principalmente citosólica, y el aumento en el contenido citoplasmático de Cu se correlaciona con un aumento en la cantidad de Cu unido a ella. En hepatocitos mantenidos a  $25\ \mu\text{M}$

de  $^{64}\text{Cu}$ , [Steinebach y Wolterbeek \(1993\)](#) determinaron que el 50% del Cu de la fracción citosólica está unido a MT. En el hígado de ratas se determinó que el contenido de Cu presente en la fracción soluble fue de 65% del cual, el 60% está unido a MT ([Saito y Kogima, 1997](#)). En este contexto, estudios realizados en fibroblastos portadores de un transportador ATP7A no funcional, se ha observado que la retención del Cu celular es de 3 a 10 veces respecto a los fibroblastos normales ([Goka y Howell, 1978](#), [Chan y cols, 1978](#), [Camakaris y cols, 1980](#)) y que este exceso se distribuye principalmente en MT ([Beratis y cols, 1978](#), [Onishi y cols, 1980](#), [LaBadie y cols, 1981 a y b](#), [Bonewitz y Howell, 1981](#), [Riordan y Jolicoeur-Paquet, 1982](#)). El mayor contenido del Cu recién incorporado en el citosol encontrado en los fibroblastos tratados a 5  $\mu\text{M}$  de  $^{64}\text{Cu}$ -His por 3 h, se mantuvo luego de 24 h de exposición, siguiendo el patrón de acumulación observado en cultivos de hepatocitos, los cuales mantienen a las 14 h de tratamiento igual proporción de  $^{64}\text{Cu}$  en la fracción citosólica (70%) que a los 15 min de incubación ([Schilsky y cols, 1998](#)). Esto indica que las asociaciones moleculares que establece el Cu, que se incorpora y es retenido por la célula, son estables al menos por 24 h (lo cual equivale a un ciclo de división celular) y permiten sugerir que el Cu retenido representan la población de Cu que se incorpora a cupro-enzimas durante su síntesis *de novo*. En fibroblastos que expresan MT existe además, la posibilidad que parte de esta población de Cu se una a la MT previamente cargada de Zn (MT-7Zn) para constituir de esta forma una población de MT-6Zn-1Cu y/o sea secuestrado por MT durante su síntesis formando MT-12 Cu (ver modelo más adelante).

Con estos antecedentes, nuestros resultados sugieren que a una concentración fisiológica de exposición a Cu, la presencia de MT otorga una opción de secuestro y/o almacenamiento celular de Cu, que no es suplida en su totalidad por las otras proteínas relacionadas con el manejo de Cu.

A concentraciones supra-fisiológicas de Cu, los fibroblastos que no expresan MT tuvieron una menor tasa de acumulación que los fibroblastos silvestres, manteniéndose la diferencia en el contenido de Cu observada entre las líneas celulares a una concentración fisiológica del metal. Sin embargo, a diferencia de lo anterior, ambas líneas celulares fueron sensibles a la toxicidad generada por la exposición al metal (**Figura 10**). La exposición a concentraciones crecientes de Cu, disminuye la viabilidad en una manera dependiente de la concentración de Cu extracelular, siendo este efecto mayor en las células que no expresan MT. Suponiendo que la toxicidad es consecuencia de un aumento del contenido intracelular, se evaluó la relación entre la viabilidad celular y el contenido interno de Cu en los fibroblastos con y sin MT. Este análisis mostró una correlación negativa significativa entre ambos parámetros, pero a su vez, se encontró que la pendiente de la ecuación que describe la relación entre la viabilidad y el contenido interno de Cu fue significativamente diferente en los fibroblastos mutantes. Esto se traduce en que, a un mismo contenido intracelular del metal la viabilidad es menor en los fibroblastos mutantes. Este mismo fenómeno ha sido observado en células MT (-/-) expuestas a Cd y Pb ([Liu y cols, 2000](#), [Park y cols, 2001](#), [Qu y cols, 2002](#)).

En todos estos casos, la ausencia de la proteína en células expuestas a altas concentraciones de los metales, se correlaciona con un menor contenido intracelular del metal respecto a las células control, y a una menor viabilidad. Siendo MT una proteína que tiene la capacidad de unir todos estos metales, ella podría constituir un tipo de unión segura que permite secuestrar o almacenar el metal. De esta forma, a concentraciones supra-fisiológicas de Cu, aumenta la población de almacenamiento, y como consecuencia de su unión en una condición segura, se evita la toxicidad.

#### **Incorporación y eflujo de Cu celular**

El análisis de la incorporación de Cu no mostró diferencias en la tasa de incorporación del metal entre fibroblastos mutantes y silvestres. En atención a que la oferta de  $^{64}\text{Cu}$  en el medio de cultivo representa prácticamente la totalidad del Cu disponible, este resultado sugiere que la presencia de MT no repercute en el proceso de entrada de Cu a la célula. Considerando que la diferencia en la acumulación de Cu en los fibroblastos pudiera ser parte de una respuesta a una modulación diferencial en la tasa de incorporación en estas células cuando son tratadas con altas concentraciones de Cu extracelular, se realizó el ensayo de incorporación en fibroblastos pre-tratados por 24 h con 250  $\mu\text{M}$  Cu-His. En estas condiciones, ambas líneas celulares disminuyeron su tasa de incorporación, lo cual es esperado como parte de la respuesta celular para mantener la homeostasis de Cu (Linder, 2002). Contrariamente, la

incorporación de Cu aumenta en células de Caco-2 (un modelo de células polarizadas de epitelio intestinal) pre-expuestas a Cu ([Arredondo y cols, 2000](#), [Linder, 2002](#)). Esta oposición puede ser consecuencia de la especialización del epitelio intestinal en su función de sensor y regulador del nivel plasmático de Cu. Por otro lado, se observó una leve pero significativa diferencia entre ambas líneas celulares, siendo la disminución en la incorporación de Cu mayor en los fibroblastos mutantes que en los fibroblastos silvestres, lo cual podría contribuir a explicar la menor acumulación del metal en estas células. La incorporación de Cu en las células está dada por la actividad de dos transportadores CTR1 y DMT1. Ambas proteínas han sido recientemente clonadas por lo que su función y regulación esta aún en estudio. El DMT1 es un transportador de Fe, pero se ha sugerido que transporta otros cationes divalentes ([Gunshin y cols, 1997](#)), de tal manera que disminuir su actividad significaría una disminución en el contenido de Fe. Efectivamente, se observó una disminución en el contenido de Fe por AAS en los fibroblastos mutantes y silvestres tratados a una concentración supra-fisiológica (50-250  $\mu\text{M}$ ) por 72 h, sin embargo, esta disminución también podría ser explicada por la competencia en el transporte de Fe cuando hay un exceso de Cu extracelular. El CTR1 es un transportador específico para  $\text{Cu}^{+1}$  de alta afinidad ([Lee y cols, 2001](#)). Este transportador se expresa constitutivamente en la membrana plasmática de levaduras, y la regulación de su actividad en respuesta a la exposición a Cu en estos organismos es post traduccional, siendo rápidamente endocitado cuando la concentración de Cu es alta en el medio extracelular ([Ooi y cols, 1996](#)). Un

estudio realizado en células HeLa y Caco-2 mostró que en respuesta a la concentración de Cu estas dos líneas celulares no cambian la localización de CTR1, sin embargo, también mostró que hay una variabilidad en el patrón de localización de CTR1 en distintas líneas celulares de mamíferos (vesículas intracelulares y en la membrana plasmática) (Klomp y cols, 2002).

El análisis de la excreción celular de Cu mostró que la salida del Cu recién incorporado entre los fibroblastos es equivalente. Esta salida se compone de una fase rápida y una fase lenta, como ha sido observado para la salida de Cu en fibroblastos y hepatocitos (Waldrop y Ettinger 1990, Darwish y cols, 1984, Schmitt y cols, 1983). Es interesante notar que durante el periodo de caza se observa la salida de sólo de un porcentaje del Cu recién incorporado, mientras que otra cantidad mayor (65%) se retiene en la célula por al menos el tiempo del ensayo (90 min de caza). Un porcentaje de retención similar (61 %) fue observado en un cultivo primario de hepatocitos (Darwish y cols, 1984), lo que en conjunto con nuestros resultados sugieren que, el Cu recién incorporado se distribuye en dos poblaciones intracelulares, una de salida rápida y otra de salida lenta. La existencia de estas dos poblaciones del Cu intracelular, ha sido propuesta por otros investigadores en células Caco-2 y cultivos primarios de hepatocitos (Arredondo y cols, 2000, Bingham y cols, 1997). La salida del Cu de la célula es a través de la unión del metal a Atox 1, proteína que lo entrega al transportador ATP7A, de manera que una salida rápida del Cu recién incorporado debe ser consecuencia de la rápida asociación del metal con la chaperona. Esto podría ocurrir por la unión directa del Cu entrante a Atox1, o

por el rápido relevo del Cu a la chaperona. En la salida lenta en cambio, debe haber un mayor número de transferencias de Cu o una transferencia más lenta del Cu a Atox1. La velocidad de transferencia puede estar dada por el tipo de unión del Cu a las moléculas. Así, bajo este supuesto se espera que la unión del metal a apo-enzimas (CCO, SOD1, Cp, Lox) constituya parte de la transferencia lenta, dado que esta interacción durará tanto como sea la vida media de dichas enzimas. Por otro lado, las chaperonas unen con una alta afinidad el Cu (Rae y cols, 1999, Huffman y O'Halloran, 2001) y su función compromete la transferencia del átomo de Cu vectorialmente hacia su cuproproteína receptora. De manera que estas proteínas tendrían que pertenecer a la población de equilibrio lento (a excepción de atox1). Los otros dos candidatos para el relevo de Cu son GSH y MT. Dada su abundancia, y la labilidad de la unión que establece con el Cu, es altamente probable que GSH componga la población de equilibrio rápido del Cu celular. Al contrario, siendo MT una proteína abundante, que tiene una alta capacidad y una alta afinidad en la unión a Cu, ésta podría ser el principal componente de la población de recambio lento. En apoyo a esta idea, se ha observado en cultivo primario de hepatocitos que la inducción de la expresión de MT aumenta la población de Cu que no es extraída por diamsar, un quelante de Cu de alta afinidad (Bingham y cols, 1997).

Aunque los resultados de esta tesis mostraron que no hay una diferencia significativa en el eflujo del Cu recién incorporado entre los fibroblastos, se observó en algunos ensayos un 10% más en el valor de retención de  $^{64}\text{Cu}$  a

favor de los fibroblastos silvestres. Esta pequeña diferencia en el tiempo puede explicar, en parte, la mayor tasa de acumulación observada en los fibroblastos silvestres. Por otro lado, es posible también, que la mayor acumulación de Cu en los fibroblastos silvestres sea consecuencia de la retención diferencial del Cu previamente almacenado (Cu frío). El análisis de la excreción de Cu se ve dificultado por el límite de detección del AAS. El AAS tiene un límite de detección en ppb, equivalente a 16 pmoles de Cu. Nuestros ensayos indican que los fibroblastos acumulan alrededor de 2 pmoles luego de 12 min de exposición a 1  $\mu$ M de Cu. Suponiendo que esta es una condición cercana al equilibrio dada la baja concentración del Cu, se podría esperar que las células no estén acumulando Cu y que, por lo tanto, deberían estar excretando igual cantidad en el mismo período de tiempo. Los cálculos teóricos indican que se necesitan 20 millones de células para medir cantidades de Cu que están en el límite de detección del equipo, lo que está fuera de las posibilidades de manejo. Otra posibilidad para cuantificar la salida del Cu de la célula es utilizar el isótopo radiactivo ( $^{64}\text{Cu}$ ), pero hay que tener en consideración que la corta vida media de éste (12,7 h), excluye del análisis al metal unido a proteínas de la población de recambio lento, dado que la vida media de algunas de ellas, es mayor a la del isótopo.

La proteína ATP7A, junto con su homóloga ATP7B que se expresa particularmente en células hepáticas, son los únicos transportadores de Cu responsables de la salida del Cu celular descritos hasta la fecha ([Vulpe, y cols, 1993](#), [Chelly y Monaco, 1993](#) y [Mercer y cols, 1993](#), [Tanzi y cols, 1993](#), [Bull y](#)

cols, 1993, Yamaguchi y cols, 1993). Este transportador se localiza principalmente en el TGN (Yamaguchi y cols, 1996, La Fontaine y cols, 1998), pero se ha descrito su re localización en la membrana plasmática de las células inducidas por la exposición a una concentración supra-fisiológica del metal (Petris y cols, 1998, Strausak y cols, 1999). Mediante estudios de transfección, se ha descrito que esta proteína cicla entre la membrana plasmática y el TGN a concentraciones fisiológicas de Cu. En este trabajo se observó que, tanto en la membrana plasmática como en el TGN, el ATP7A es funcional. Esto sugiere la existencia de dos rutas de salida del Cu celular utilizadas normalmente en células expuestas a concentraciones fisiológicas de Cu extracelular. Tomando ventaja del bloqueo que produce la disminución de la temperatura del ensayo (desde 37 °C a 20 °C) en el movimiento de vesículas desde el TGN (Brandli y Simons, 1989, Matlin y Simons, 1983), se determinó que el porcentaje de la excreción del Cu recién incorporado que es sensible a temperatura es el doble en los fibroblastos silvestres que en los fibroblastos mutantes (Figura 20). La observación de que al estimular la traslocación con un exceso extracelular de Cu, ambas líneas celulares disminuyen el porcentaje del eflujo que es dependiente de temperatura sugiere que la respuesta se relaciona con la localización diferencial del transportador. La re localización específica del transportador en los fibroblastos fue observada por IFI cuando éstos fueron tratados con 200 µM de Cu-His por 3 h, no observándose cambios en la localización de una proteína de citoesqueleto (actina) o de matriz extracelular (N-Caderina) (datos no mostrados).

Estos resultados muestran que los fibroblastos MT (-/-) tienen una mayor salida de Cu que es independiente de temperatura, lo que podría ser explicado por una mayor cantidad de transportador localizado en, o más próximo a, la membrana plasmática. No fue posible demostrar que la cantidad de transportador en la membrana plasmática de los fibroblastos mutantes fuera mayor. Se realizaron experimentos de biotinylación de las proteínas de superficie para luego inmunodetectar la ATP7A con anticuerpos específicos (donados por el Dr. Mercer). El resultado de este experimento fue negativo, probablemente debido a la ausencia de grandes dominios proteicos hacia la cara extracelular. El análisis de comparación de secuencia y de hidrofobicidad sugiere que esta proteína tiene 8 dominios trans-membrana, cuyo extremo amino y carboxilo terminal se encuentran hacia la cara citosólica y no presenta largas secuencias que sobresalgan hacia el espacio extracelular (Schaefer y Gitlin, 1999). De esta manera, creemos que su estructura dificulta la unión de la moléculas de biotina. Se realizó un segundo intento a través de la cuantificación de la unión de estos anticuerpos en células no permeabilizadas mediante citometría de flujo. Este resultado también fue infructuoso, probablemente porque el antígeno utilizado en la fabricación del anticuerpo corresponde a una gran porción de su secuencia amino terminal, que como ya fue dicho, se localiza en la cara citoplasmática.

La observación de que, en condiciones fisiológicas, ambas rutas de salida (TGN- o MP-dependiente) están operando en los fibroblastos sugiere la posibilidad de que ellas compongan parte de las poblaciones de salida lenta y

rápida, dado que la incorporación a vesículas debe suponer un enlentecimiento al flujo por la velocidad del movimiento de ellas y porque el Cu puede ser utilizado en la vía de síntesis de metaloproteínas de secreción (Petris y cols, 2000).

### **Regulación de la expresión génica de proteínas relacionadas con el metabolismo celular de Cu**

El análisis de la expresión de genes relacionados con el metabolismo celular de Cu mostró que fibroblastos mutantes y silvestres tienen una respuesta diferencial a la exposición a una concentración supra-fisiológica de Cu. Entre los genes analizados, fibroblastos silvestres incrementaron la expresión de genes que codifican para MT, Ccs1, SOD1 y en menor extensión, para Atox1. El incremento de la expresión de los genes que codifican para MT y SOD1 observados en este experimento, sigue el mismo patrón de regulación al observado en levaduras (Pena y cols, 1999). El mecanismo de regulación de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de Cu difiere en mamíferos y levaduras, como resultado de la amplificación del número de factores de transcripción involucrados en esta función. Sin embargo, el efecto es conservado, de manera tal, que los genes que son inducidos por el estímulo son generalmente los mismos. Esto explicaría porque los genes que codifican para MT I y SOD1, que son regulados por el mismo factor transcripcional Ace 1 en levaduras (Winge y cols, 1998), y que no tienen factores de transcripción

comunes en mamíferos, presenten una respuesta similar a la exposición a Cu. Una posible ruta de activación de SOD1 por Cu es a través de Egr-1, uno de los factores de transcripción que regula la expresión de esta proteína (Minc y cols, 1999) y que puede ser inducido por Cu (Pang y Chau, 1999).

El resultado de este análisis sugiere que, como parte del mecanismo de respuesta a la exposición a Cu, se induce la expresión de las chaperonas Atox1 y Ccs1. Este incremento tiene sentido con la idea de aumentar la transferencia del Cu hacia rutas que involucran detoxificación, ya sea para su utilización en la síntesis de SOD1 o de la excreción del metal a través del ATP7A. Es interesante notar, que del grupo de genes analizados, el que presentó un mayor aumento fue el gen que codifica para MT I.

La respuesta en la expresión génica inducida por metales resultó alterada en ausencia de MT. La observación de que el aumento en el contenido de Cu no es suficiente en estas células para inducir la expresión de los genes antes mencionados, sugiere que la presencia de MT es requerida para esta modulación. Un ejemplo de esta posible regulación, es sugerido en el metabolismo de GSH. La enzima limitante en la síntesis de GSH es la  $\gamma$ -glutamil sintetasa, la que es dependiente de la actividad del factor de transcripción con dedos de zinc, MTF-1. La unión al DNA de este factor es regulada de manera reversible por la interacción con Zn, y debido a que su unión tiene una constante de disociación en el rango micromolar, este factor es considerado un sensor de cambios en la disponibilidad intracelular de este metal (Palmiter,

1994, Bittel y cols, 1998). MTF-1 también regula la expresión modulada por metales de MT I/II. Estudios con células provenientes de ratones que no expresan MTF-1, sugieren que la inducción de la expresión por metales de MT es a través de la actividad de MTF-1 (Gunes y cols, 1998). Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que sólo Zn es capaz de promover la unión de este factor transcripcional a las secuencias respondedoras a metales (MRE) del DNA (Palmiter, 1994; Bittel y cols., 1998). De esta manera, hemos propuesto que la inducción de la expresión génica mediada por metales es a través de la unión de ellos a MT. Dado que MT tiene una afinidad mayor por Cu que por Zn, el aumento en el contenido celular de Cu generaría un relevo de átomos de Zn que localmente serían sentidos por MTF-1. Según este modelo, el menor contenido de GSH, de los fibroblastos MT (-/-) podría ser explicado en parte, por una expresión disminuída de la enzima  $\gamma$ -glutamil sintetasa.

El requerimiento de MT en la regulación de la expresión de proteínas incluye la regulación de sí misma como fue observado en el ensayo del macroarreglo y verificado en un ensayo de Multiplex. Una inducción disminuída de MT también fue observado en ratones MT (-/-) cuando fueron tratados con una dosis de Zn (Davies y cols, 1998). Los resultados del análisis de la expresión génica podría explicar en parte, la mayor sensibilidad de células MT (-/-) a un menor contenido intracelular del metal.

## CONCLUSIONES

- 1) MT no es esencial para la supervivencia ni la tasa de crecimiento de los fibroblastos a una concentración sub-fisiológica de Cu. En estas condiciones, la función de MT probablemente es sustituida por otros componentes asociados al metabolismo de Cu, como GSH y chaperonas de Cu.
- 2) La presencia de MT se correlaciona con un aumento en el contenido intracelular de Cu, principalmente en la fracción citosólica de los fibroblastos mantenidos a una concentración fisiológica del metal.
- 3) La acumulación de Cu observada en los fibroblastos expuestos a una concentración fisiológica del metal, no está dada por un cambio en la tasa de entrada del Cu ni por la salida del Cu recién incorporado, sugiriendo que la acumulación de Cu es producida por la disminución en la salida del Cu de recambio lento.
- 4) La presencia de MT, a una concentración fisiológica de Cu, se asocia con una ruta de salida del Cu recién incorporado preferentemente por una vía TGN-dependiente.
- 5) MT es inducida por la exposición a una concentración supra-fisiológica de Cu.
- 6) La presencia de MT se asocia con un aumento en la resistencia al incremento en el contenido intracelular de Cu.



a GSH (flecha 2); de tal manera, que el Cu unido a MT es parte de la población de recambio lento. El Cu unido a GSH es disponible para su utilización por las chaperonas de Cu. La destinación del Cu a atox1 (flecha 3), lo compromete en la ruta de salida de la célula; esta unión temprana genera la población de salida rápida, especialmente a través del ATP7A localizada en la membrana plasmática. Por otro lado, el tipo de unión (de alta afinidad e irreversible) que establece el Cu con las cupro-enzimas a través de sus chaperonas (flecha 4), compromete al metal a la población de recambio lento.

Considerando que la ausencia de MT no modifica la viabilidad ni la tasa de crecimiento de los fibroblastos mantenidos a una concentración sub-fisiológica de Cu, esto sugiere que GSH y chaperonas son suficientes para aportar Cu a las cupro-enzimas. Cuando las células son expuestas a una concentración fisiológica de Cu, aumenta el contenido de este metal principalmente en el citosol. En estas condiciones se espera que la utilización del Cu por las chaperonas no aumente (o lo haga levemente), provocando de esta forma, un incremento en la población de Cu unido a GSH. Esto cambia el equilibrio en la transferencia del Cu entre MT y GSH, de manera que aumenta el almacenamiento del Cu en MT. Dado que a esta concentración, MT no aumenta su expresión, el modelo sugiere que el Cu se almacena como MT-6Zn/1Cu. En ausencia de MT, el aumento de Cu en GSH incrementa la transferencia de átomos de Cu a las chaperonas, lo que en el caso de atox1, lleva a un aumento en el contenido del transportador ATP7A en la membrana plasmática (proteína que es capaz de sensor el contenido intracelular de Cu). A una concentración supra-fisiológica de Cu, el aumento en el contenido celular de Cu incrementa el número de átomos del metal unidos a las diferentes chaperonas, pero dicho aumento está limitado por la velocidad de recambio de las cuproenzimas. El exceso intracelular del metal debe ser entonces recogido por GSH y MT. El aumento en el número de átomos de Cu que se unen a MT incrementa el número de átomos de Zn desplazados de la proteína (flecha 5). El aumento en el contenido de Zn provoca al nivel de núcleo, un cambio en la

actividad de factores de transcripción dependientes de Zn. Un número importante de evidencias indica que Zn induce la actividad transcripcional del factor MTF-1, el cual regula la expresión del gen de MT. De esta manera aumenta la síntesis de MT, la que secuestra el exceso intracelular de Cu en una configuración MT-12Cu protegiendo a la célula (flecha 6).

De esta forma, se propone que MT mantiene una apropiada regulación homeostática del Cu intracelular, en las células mantenidas a una concentración fisiológica y especialmente en respuesta a un exceso de Cu extracelular. Dicha respuesta depende de la capacidad de MT de almacenar Cu en forma fisiológica y frente al exceso secuestrar el Cu intracelular en forma segura.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Amaravadi, R., Glerum, D.M., Tzagoloff, A. 1997. Isolation of a cDNA encoding the human homolog of COX17, a yeast gene essential for mitochondrial copper recruitment. *Hum Genet.* 99(3):329-33.
2. Arredondo, A., Uauy, R., González, M. 2000. Regulation of copper uptake and transport in intestinal cell monolayers by acute and chronic copper exposure. *Biochem. Biophys. Acta.* 1474: 169-176.
3. Aschner M. 1996. The functional significance of brain metallothioneins. *FASEB J.* Aug;10(10):1129-36.
4. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. In: *Short Protocols in Molecular Biology*, Third Ed. John Wiley and Sons, Eds. 1995.
5. Bar-Or, D., Winkler, J.V. 2002. Copper is involved in hydrogen-peroxide-induced DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 197-199.
6. Beach, L.R. y Palmiter, R.D. 1981. Amplification of the metallothionein-I gene in cadmium-resistant mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 2110-2114.
7. Beratis, N.G., Price, P., Labadie, G., Hirschhorn, K. 1978.  $^{64}\text{Cu}$  metabolism in Menkes and normal cultured skin fibroblasts. *Pediatr. Res.* 12: 699-702.
8. Bingham, M.J., Sargeson, A.M., McArdle, H.J. 1997. Characterization of intracellular copper pools in rat hepatocytes using the chelator diamsar. *Am. J. Physiol.* 272: G1400-1407.
9. Bittel, D., Dalton, T., Samson, S.L., Gedamu, L., Andrews, G.K. 1998. The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated in vivo and in vitro by zinc, but not by other transition metals. *J. Biol. Chem.* 273: 7127-7133.
10. Blackburn, N.J., Ralle, M., Hassett, R., Kosman, D.J. 2000. Spectroscopic analysis of the trinuclear cluster in the Fet3 protein from yeast, a multinuclear copper oxidase. *Biochemistry.* 39: 2316-2324.
11. Bonewitz, R.F. y Howell, R.R. 1981. Synthesis of a metallothionein-like protein in cultured human skin fibroblasts: relation to abnormal copper distribution in Menkes' disease. *J. Cell Physiol.* 106: 339-48.
12. Brandli, A.W., Simons, K. 1989. A restricted set of apical proteins recycle through the trans-Golgi network in MDCK cells. *EMBO J.* 8: 3207-3213.
13. Bremner, I., Davies, N.T. 1975. The induction of metallothionein in rat liver by zinc injection and restriction of food intake. *Biochem. J.* 149(3):733-8.
14. Bremner, I. 1998 Manifestations of copper excess. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 1069S-1073S.

15. Bremner, I. y Beattie, H. 1990. Metallothionein and the trace minerals. *Annu. Rev. Nutr.* 10: 63-83.
16. Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., Kretzschmar, H. 1997. The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature*. 390: 684-687.
17. Brugnera E, Georgiev O, Radtke F, Heuchel R, Baker E, Sutherland GR, Schaffner W. 1994. Cloning, chromosomal mapping and characterization of the human metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res.* 22(15):3167-73.
18. Bull, P.C., Thomas, G.R., Rommens, J.M., Forbes, J.R., Cox, D.W. 1993. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat. Genet.* 5: 327-337.
19. Camakaris, J., Danks, D.M., Ackland, L., Cartwright, E., Borger, P., Cotton, R.G. 1980. Altered copper metabolism in cultured cells from human Menkes' syndrome and mottled mouse mutants. *Biochem. Genet.* 18(1-2):117-31
20. Camakaris, J., Petris, M.J., Bailey, L., Shen, P., Lockhart, P., Glover, T.W., Barcroft, C., Patton, J., Mercer, J.F. 1995. Gene amplification of the Menkes (MNK; ATP7A) P-type ATPase gene of CHO cells is associated with copper resistance and enhanced copper efflux. *Hum. Mol. Genet.* 4: 2117-2123.
21. Cano-Gauci DF y Sarkar B. 1996. Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger. *FEBS Lett.* 386(1):1-4.
22. Chan, W.Y., Garnica, A.D., Rennert, O.M. 1978. Metal-binding studies of metallothioneins in Menkes kinky hair disease. *Clin. Chim. Acta.* 88: 221-228.
23. Chao, P.Y., Allen, K.G. 1992. Glutathione production in copper-deficient isolated rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med.* 12(2):145-50.
24. Chelly, J., Monaco, A.P. 1993. Cloning the Wilson disease gene. *Nat. Genet.* 5: 317-318.
25. Cherian, M.G. 1994. The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells. *Environ Health Perspect.* 102: 131-135.
26. Cherian, M.G., Apostolova, M.D. 2000. Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cell Mol. Biol.* 46(2):347-56.
27. Ciriolo, M.R., Desideri, A., Paci, M., Rotilio, G. 1990. Reconstitution of Cu,Zn-superoxide dismutase by the Cu(I) glutathione complex. *J. Biol. Chem.* 265: 11030-11034.
28. Coyle P., Philcox J. C, Rofe A. M. 1995. Hepatic zinc in metallothionein-null mice following zinc challenge: *in vivo* and *in vitro* studies. *Biochem. J.* 309:25-31

29. Culotta, V.C., Klomp, L.W., Strain, J., Casareno, R.L., Krems, B., Gitlin, J.D. 1997. The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272(38):23469-72.
30. Da Costa Ferreira, A.M., Ciriolo, M.R., Marcocci, L., Rotilio, G. 1993. Copper(I) transfer into metallothionein mediated by glutathione. *Biochem. J.* 292: 673-676.
31. Dalton T, Fu K, Palmiter RD, Andrews GK. 1996. Transgenic mice that overexpress metallothionein-I resist dietary zinc deficiency. *J Nutr.* 126(4):825-33.
32. Dalton TP, Li Q, Bittel D, Liang L, Andrews GK. 1996 b. Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-1 binding activity. Occupancy in vivo of metal response elements in the metallothionein-I gene promoter. *J Biol Chem.* 271(42):26233-41.
33. Dameron CT y Harrison MD. 1998. Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am J Clin Nutr.* 67(5 Suppl):1091S-1097S
34. Darwish, H.M., Schmitt, R.C., Cheney, J.C., Ettinger, M.J. 1984. Copper efflux kinetics from rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 246: G48-55.
35. Davis, S.R., McMahon, R.J., Cousins, R.J. 1998. Metallothionein knockout and transgenic mice exhibit altered intestinal processing of zinc with uniform zinc-dependent zinc transporter-1 expression. *J Nutr.* 128: 825-831.
36. Dijkstra, M., Vonk, R.J., Kuipers, F. 1996. How does copper get into bile? New insights into the mechanism(s) of hepatobiliary copper transport. *J. Hepatology.* 24: 109-120.
37. Francis MJ, Jones EE, Levy ER, Ponnambalam S, Chelly J, Monaco AP. 1998. A Golgi localization signal identified in the Menkes recombinant protein. *Hum Mol Genet.* 7(8):1245-52.
38. Francis MJ, Jones EE, Levy ER, Martin RL, Ponnambalam S, Monaco AP. 1999. Identification of a di-leucine motif within the C terminus domain of the Menkes disease protein that mediates endocytosis from the plasma membrane. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 11):1721-32.
39. Freedman, J.H., Ciriolo, M.R., Peisach, J. 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264: 5598-5605.
40. Friedman RL, Manly SP, McMahon M, Kerr IM, Stark GR. 1984. Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell* 38(3):745-55.
41. Furey WF, Robbins AH, Clancy LL, Winge DR, Wang BC, Stout CD. 1986. Crystal structure of Cd, Zn metallothionein. *Science.* 231(4739):704-10.
42. Goka, T.J., Howell, R.R. 1978. Copper metabolism in Menkes disease. *Monogr. Hum. Genet.* 10:148-155.
43. González, M., Tapia, L., Alvarado, M., Tornero, J.D. y Fernández, R. 1999. Intracellular determination of elements in mammalian cultured cells by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 14: 885-888

44. Gunes, C., Heuchel, R., Georgiev, O., Muller, K.H., Lichtlen, P., Bluthmann, H., Marino, S., Aguzzi, A., Schaffner, W. 1998. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *EMBO J.* 17: 2846-2854.
45. Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., Hediger, M.A. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter *Nature.* 388: 482-488.
46. Hamer, D.H. 1986. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 913-951.
47. Han O, Wessling-Resnick M. 2002. Copper repletion enhances apical iron uptake and transepithelial iron transport by Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 282(3): G527-33
48. Harris ED. 2000. Cellular copper transport and metabolism. *Annu Rev Nutr.* 20:291-310.
49. Harrison, MD, Jones, CE, Dameron, CT. 1999. Copper Chaperones: function, structure and copper-binding properties. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4 (2): 145-153.
50. Harrison, M.D., Jones, C.E., Solioz, M., Dameron, C.T. 2000. Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *TIBS.* 25:29-32.
51. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol *Biotechniques* 23(3):504-11
52. Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, Stark G, Aguet M, Schaffner W. 1994. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J.* 13:2870-5.
53. Hidalgo HA, Koppa V, Bryan SE. 1978. Induction of cadmium-thionein in isolated rat liver cells. *Biochem J.* 170(2):219-225.
54. Huffman, D.L. y O'Halloran, T.V. 2001. Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 677-701.
55. Jacob C, Maret W, Vallee BL. 1998. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(7):3489-94.
56. Jiang, L.J., Maret, W. y Vallee, B.L. 1998. The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S.* 95: 3483-3488.
57. Kagi JH y Kojima Y. 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Suppl.* 52:25-61
58. Karin M y Herschman HR. 1980. Glucocorticoid hormone receptor mediated induction of metallothionein synthesis in HeLa cells. *J Cell Physiol.* 103(1):35-40.
59. Karin M, Eddy RL, Henry WM, Haley LL, Byers MG, Shows TB. 1984. Human metallothionein genes are clustered on chromosome 16. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(17):5494-8.

60. Kawai, K., Liu, S., Tyurin, V., Tyurina, Y., Borisenko, G.G., Jiang, J.F., St croix, C.M., Fabiasik, J.P., Pitt, B.R., Kagan, V.E. 2000. Antioxidant and antiapoptotic function of metallothionein in HL-60 cells challenged with copper nitilotriacetate. *Chem. Res. Toxicol.* 13: 1275-1286.
61. Kelly, E.J., Quaife, C.J., Froelick, G.J., Palmiter, R.D. 1996. Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. *J Nutr.* 126:1782-1790.
62. Kelly, E.J. y Palmiter, R.D. 1996. A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nature Genet.* 13: 219-222.
63. Klaassen CD y Liu J. 1998. Metallothionein transgenic and knock-out mouse models in the study of cadmium toxicity. *J Toxicol Sci.* 23 Suppl 2:97-102.
64. Klein D, Lichtmannegger J, Heinzmann U, Summer KH. 2000. Dissolution of copper-rich granules in hepatic lysosomes by D-penicillamine prevents the development of fulminant hepatitis in Long-Evans cinnamon rats. *J Hepatol.* 32(2):193-201.
65. Klomp LW, Lin SJ, Yuan DS, Klausner RD, Culotta VC, Gitlin JD. 1997. Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J Biol Chem.* 272(14):9221-6.
66. Klomp, A.E., Tops, B.B., Van Denberg, I.E., Berger, R., Klomp, L.W. 2002. Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1). *Biochem. J.* 364: 497-505.
67. Labadie GU, Hirschhorn K, Katz S, Beratis NG. 1981a. Increased copper metallothionein in Menkes cultured skin fibroblasts. *Pediatr. Res.* 15: 257-261.
68. LaBadie GU, Beratis NG, Price PM, Hirschhorn K. 1981b. Studies of the copper-binding proteins in Menkes and normal cultured skin fibroblast lysates. *J Cell Physiol.* 106: 173-178.
69. La Fontaine, S.L., Firth, S.D., Camakaris, J., Englezou, A., Theophilos, M.B., Petris, M.J., Howie, M., Lockhart, P.J., Greenough, M., Brooks, H., Reddel, R.R., Mercer, J.F. 1998. Correction of the copper transport defect of Menkes patient fibroblasts by expression of the Menkes and Wilson ATPases. *J. Biol. Chem.* 273: 31375-31380.
70. Labbe, S., Zhu, Z., Thiele, D.J. 1997. Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J. Biol. Chem.* 272: 15951-15958.
71. Lau JC y Cherian MG. 1998. Developmental changes in hepatic metallothionein, zinc, and copper levels in genetically altered mice. *Biochem Cell Biol.* 76(4):615-23.
72. Lee, J., Prohaska, J.R., Dagenais, S.L., Glover, T.W., Thiele, D.J. 2000. Isolation of a murine copper transporter gene, tissue specific expression and functional complementation of a yeast copper transport mutant. *Gene.* 254: 87-96.

73. Lee, J, Prohaska, J.R., Thiele, D.J. 2001. Essential role for mammalian copper transporter *ctr1* in copper homeostasis and embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 6842-6847.
74. Lee, J., Peña, M.M., Nose, Y., Thiele, D.J. 2002. Biochemical characterization of the human copper transporter *Ctr1*. *J. Biol. Chem.* 277: 4380-4387.
75. Li H y Otvos JD. 1996. HPLC characterization of Ag<sup>+</sup> and Cu<sup>+</sup> metal exchange reactions with Zn- and Cd-metlothioneins. *Biochemistry* 35(44):13937-45.
76. Linder MC y Hazegh-Azam M. 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr.* 63(5):797S-811S
77. Linder, M.C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R., Lomeli, N. 1998. Copper transport. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 965S-971S.
78. Linder, M.C. 2002. Biochemistry and Molecular Biology of Copper in Mammals. En E.J. Massaro (eds), *Handbook of Koper Pharmacology and Toxicology*. Pp 3 – 32. Human Press, New Jersey.
79. Liu, S.X., Fabisiak, J.P., Tyurin, V.A., Borisenko, G.G., Pitt, B.R., Lazo, J.S. y Kagan, V.E. 2000. Reconstitution of apo-superoxide dismutase by nitric oxide-induced copper transfer from metallothioneins. *Chem. Res. Toxicol.* 13: 922-931.
80. Luk, EE. y Culotta, VC. 2001. Manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* acquires its metal co-factor through a pathway involving the Nramp metal transporter, *Smf2p*. *J Biol Chem.* 276(50): 47556-62.
81. Maret W. 1994. Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(1):237-41.
82. Maret W, Larsen KS, Vallee BL. 1997. Coordination dynamics of biological zinc "clusters" in metallothioneins and in the DNA-binding domain of the transcription factor Gal4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(6):2233-2237.
83. Maret W y Vallee BL. 1998. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7):3478-82.
84. Maret W, Jacob C, Vallee BL, Fischer EH. 1999. Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(5):1936-40.
85. Margoshes, M., Vallee, B.L. 1957. A Cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 4813-4814
86. Martins, L.J., Jensen, L.T., Simon, J.R., Keller, G.L., Winge, D.R., Simons, J.R. 1998. Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273: 23716-23721.
87. Mas, A. y Sarkar, B. 1992. Uptake of <sup>67</sup>Cu by isolated human trophoblast cells. *Biochim Biophys Acta.* 1135: 123-128.
88. Masters, B.A., Quaife, C.J., Erickson, J.C., Kelly, E.J., Froelick, G.J., Zambrowicz, B.P., Brinster, R.L., Palmiter, R.D. 1994. Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J. Neurosci.* 14: 5844-5857.

89. Masters BA, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL, Palmiter RD. 1994 b. Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(2):584-8
90. Matlin, K.S., Simons, K. 1983. Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation. *Cell*. 34: 233-243.
91. McArdle, H.J., Gross, S.M., Danks, D.M. 1988. Uptake of copper by mouse hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* 136: 373-378.
92. Mercer, J.F., Livingston J., Hall, B., Paynter, J.A., Begy, C., Chandrasekharappa, S., Lockhart, P., Grimes, A., Bhave, M., Siemieniak, D. 1993. Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nat Genet.* 3: 20-25.
93. Meyer, L.A., Durley, A.P., Prohaska, J.R., Harris, Z.L. 2001. Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice. *J. Biol. Chem.* 276: 36857-36861.
94. Michalska, A.E. y Choo, K.H. 1993. Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the MT I and II loci in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 8088-8092.
95. Minc, E., de Coppet, P., Masson, P., Thiery, L., Dutertre, S., Amor-Gueret, M., Jaulin, C. 1999. The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J. Biol. Chem.* 274: 503-509.
96. Mizzen CA, Cartel NJ, Yu WH, Fraser PE, McLachlan DR. J. 1996. Sensitive detection of metallothioneins-1, -2 and -3 in tissue homogenates by immunoblotting: a method for enhanced membrane transfer and retention. *Biochem Biophys Methods* 32(2):77-83
97. Moffatt P y Seguin C. 1998. Expression of the gene encoding metallothionein-3 in organs of the reproductive system. *DNA Cell Biol.* 17(6):501-10.
98. Mohan, P., Failla, M., Bremner, I., Arthurd-Smith, A., Kerzner, B. 1995. Biliary copper excretion in the neonatal rat: role of glutathione and metallothionein. *Hepatology* 21: 1051-1057.
99. Munger K, Germann UA, Beltramini M, Niedermann D, Baitella-Eberle G, Kagi JH, Lerch K. 1985. (Cu,Zn)-metallothioneins from fetal bovine liver. Chemical and spectroscopic properties. *J Biol Chem.* 260(18):10032-8.
100. Myers, B.M., Prendergast, F.G., Holman, R., Kuntz, S.M., Larusso, N.F. 1993. Alterations in hepatocyte lysosomes in experimental hepatic copper overload in rats. *Gastroenterology.* 105: 1814-1823.
101. Nagano K, Nakamura K, Urakami KI, Umeyama K, Uchiyama H, Koiwai K, Hattori S, Yamamoto T, Matsuda I, Endo F. 1998. Intracellular distribution of the Wilson's disease gene product (ATPase7B) after in vitro and in vivo exogenous expression in hepatocytes from the LEC rat, an animal model of Wilson's disease. *Hepatology* 27(3):799-807.

102. Nagano T, Itoh N, Ebisutani C, Takatani T, Miyoshi T, Nakanishi T, Tanaka K. 2000. The transport mechanism of metallothionein is different from that of classical NLS-bearing protein. *J Cell Physiol.* 185(3):440-6.
103. Oh SH, Deagen JT, Whanger PD, Weswig PH. 1978. Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by various stresses. *Am J Physiol.* 234(3):E282-5.
104. Onishi, T., Inubushi, H., Tokugawa, S., Muramatsu, M., Nishikawa, K., Suzuki, Y., Miyao, M. 1980. Abnormal copper metabolism in Menkes cultured fibroblasts. *Eur. J. Pediatr.* 134: 205-210.
105. Ooi, C.E., Rabinovich, E., Dancis, A., Bonifacino, J.S., Klausner, R.D. 1996. Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J.* 15: 3515-23.
106. Palmiter, R.D. 1994. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 1219-1223.
107. Palmiter, R.D. 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 8428-8430.
108. Panemangalore M, Banerjee D, Onosaka S, Cherian MG. 1983. Changes in the intracellular accumulation and distribution of metallothionein in rat liver and kidney during postnatal development. *Dev Biol.* 97(1):95-102.
109. Pang JH y Chau LY. 1999. Copper-induced apoptosis and immediate early gene expression in macrophages. *Atherosclerosis* 146, 45-52.
110. Park, J.D., Liu, Y., Klaassen, C.D. 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology.* 163: 93-100.
111. Paynter JA, Camakaris J, Mercer JF. 1990. Analysis of hepatic copper, zinc, metallothionein and metallothionein-la mRNA in developing sheep. *Eur J Biochem.* 190(1):149-54.
112. Pena, M.M., Lee, J., Thiele, D.J. 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr.* 129: 1251-160.
113. Petris MJ, Mercer JF, Culvenor JG, Lockhart P, Gleeson PA, Camakaris J. 1996. Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *EMBO J.* 15(22):6084-95
114. Petris, M.J., Camakaris, J., Greenough, M., La Fontaine, S., Mercer, J.F. 1998. A C-terminal di-leucine is required for localization of the Menkes protein in the trans-Golgi network. *Hum. Mol. Genet.* 7: 2063-2071.
115. Petris MJ y Mercer JF. 1999. The Menkes protein (ATP7A; MNK) cycles via the plasma membrane both in basal and elevated extracellular copper using a C-terminal di-leucine endocytic signal. *Hum Mol Genet.* 8(11):2107-15.
116. Petris. M.J., Strausak, D., Mercer, J.F. 2000. The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum. Mol. Genet.* 9: 2845-2851.

117. Petrukhin K, Lutsenko S, Chernov I, Ross BM, Kaplan JH, Gilliam TC. 1994. Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions. *Hum Mol Genet.* 3(9):1647-56.
118. Philcox J. C., Coyle P., Michalska A., Choo K. H., Rofe A.M. 1995. Endotoxin-induced inflammation does not cause hepatic zinc accumulation in mice lacking metallothionein gene expression. *Biochem. J.* 308:543-546.
119. Qu, W., Diwan, B.A., Liu, J., Goyer, R.A., Dawson, T., Horton, J.L., Cherian, M.G., Waalkes, M.P. 2002. The metallothionein-null phenotype is associated with heightened sensitivity to lead toxicity and an inability to form inclusion bodies. *Am. J. Pathol.* 160:1047-56.
120. Quaife C, Hammer RE, Mottet NK, Palmiter RD. 1986. Glucocorticoid regulation of metallothionein during murine development. *Dev Biol.* 118(2):549-55.
121. Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD. 1994. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 33(23):7250-9.
122. Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., O'Halloran, T.V. 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science.* 284:805-808.
123. Ralph, A. Y McArdle, H. 2001. En International Copper Association eds, *Copper Metabolism and Requirements in the Pregnant Mother, Her Fetus, and Children.* pp 1-10. ICA, New York.
124. Reeves PG, Briske-Anderson M, Newman SM Jr. 1996. High zinc concentrations in culture media affect copper uptake and transport in differentiated human colon adenocarcinoma cells. *J Nutr.* 126:1701-12.
125. Reeves PG, Briske-Anderson M, Johnson L. 1998. Physiologic concentrations of zinc affect the kinetics of copper uptake and transport in the human intestinal cell model, Caco-2. *J Nutr.* 128(10):1794-801.
126. Riordan JR, Jolicoeur-Paquet L. 1982. Metallothionein accumulation may account for intracellular copper retention in Menkes' disease. *J Biol. Chem.* 257: 4639-4645.
127. Rucker RB, Kosonen T, Clegg MS, Mitchell AE, Rucker BR, Uriu-Hare JY, Keen CL. 1998. Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am J Clin Nutr.* 67(5 Suppl):996S-1002S.
128. Saito, S. y Kojima, Y. 1997. Differential role of metallothionein on Zn, Cd and Cu accumulation in hepatic cytosol of rats. *Cell Mol Life Sci.* 53: 267-270.
129. Schaefer, M., Gitlin, J.D. 1999. Genetic disorders of membrane transport. IV. Wilson's disease and Menkes disease. *Am. J. Physiol.* 276: G311-4.
130. Schilsky, M.L., Stockert, R.J., Kesner, A., Gorla, G.R., Gagliardi, G.S., Terada, K., Miura, N., Czaja, M.J. 1998. Copper resistant human hepatoblastoma mutant cell lines without metallothionein induction overexpress ATP7B. *Hepatology.* 28: 1347-1356.

131. Schmidt CJ, Hamer DH, McBride OW. 1984. Chromosomal location of human metallothionein genes: implications for Menkes' disease. *Science*. 224(4653):1104-6.
132. Schmitt, R.C., Darwish, H.M., Cheney, J.C., Ettinger, M.J. 1983. Copper transport kinetics by isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol*. 244: G183-G191.
133. Shaw CF 3rd, Savas MM, Petering DH. 1991. Ligand substitution and sulfhydryl reactivity of metallothionein. *Methods Enzymol*. 205:401-14.
134. Sokol, R.J., Devereaux, M., Mierau, G.W., Hambidge, K.M., Shikes, R.H. 1990. Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. Modification by vitamin E deficiency. *Gastroenterology*. 99:1061-1071.
135. Sone, T., Yamaoka, K., Minami, Y. y Tsunoo, H. 1987. Induction of metallothionein synthesis in Menkes' and normal lymphoblastoid cells is controlled by the level of intracellular copper. *J. Biol. Chem*. 262 (12): 5878-5885.
136. Stacey NH y Klaassen CD. 1981. Copper toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 58(2):211-20.
137. Steffens, G.C., Biewald, R., Buse, G. 1987. Cytochrome c oxidase is a three-copper, two-heme-A protein. *Eur J Biochem*. 164: 295-300.
138. Steinebach, O.M., Wolterbeek, H.T. 1994. Role of cytosolic copper, metallothionein and glutathione in copper toxicity in rat hepatoma tissue culture cells. *Toxicology*. 92: 75-90.
139. Stohs, S.J., Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions *Free Radic. Biol. Med*. 18: 321-336.
140. Strausak, D., La Fontaine, S., Hill, J., Firth, S.D., Lockhart, P.J., Mercer, J.F. 1999. The role of GMXCXXC metal binding sites in the copper-induced redistribution of the Menkes protein. *J. Biol. Chem*. 274: 11170-11177.
141. Stuart GW, Searle PF, Palmiter RD. 1985. Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. *Nature* 317(6040):828-31.
142. Suzuki M y Gitlin JD. 1999. Intracellular localization of the Menkes and Wilson's disease proteins and their role in intracellular copper transport. *Pediatr Int*. 41(4):436-42.
143. Suzuki KT y Yamamura M. 1980. Induction and degradation of copper-induced metallothioneins in rat liver as studied at isometallothionein levels. *Toxicol Lett*. 6(4-5):301-7.
144. Suzuki KT, Someya A, Komada Y, Ogra Y. 2002. Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *J Inorg Biochem*. 88(2):173-82.
145. Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Richardson, J.S., Richardson, D.C. 1983. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*. 306: 284-287.
146. Tanzi, R.E., Petrukhin, K., Chernov, I., Pellequer, J.L., Wasco, W., Ross, B., Romano, D.M., Parano, E., Pavone, L., Brzustowicz, L.M. 1993. The

- Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet.* 5: 344-50.
147. Tapia, L., Suazo, M., Hödar C., Cambiazo, V. and González, M. 2002. Copper exposure modifies the content and distribution of trace metals in mammalian cultured cells. *Biometals.* (en prensa).
  148. Terada K, Kawarada Y, Miura N, Yasui O, Koyama K, Sugiyama T. 1995. Copper incorporation into ceruloplasmin in rat livers. *Biochim Biophys Acta.* 1270(1):58-62.
  149. Uauy, R., Olivares, M., Gonzalez, M. 1998. Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 952S-959S.
  150. Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M. 1991. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7(2):337-47.
  151. Udom AO y Brady FO. 1980. Reactivation in vitro of zinc-requiring apoenzymes by rat liver zinc-thionein. *Biochem J.* 187(2):329-35.
  152. Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S., Gitschier, J. 1993. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat. Genet.* 3: 7-13.
  153. Waggoner, D.J., Bartnikas, T.B., Gitlin, J.D. 1999. The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol. Dis.* 6: 221-230.
  154. Waldrop, G.L. y Ettinger, M.J. 1990. The relationship of excess copper accumulation by fibroblasts from the brindled mouse model of Menkes disease to the primary defect. *Biochem. J.* 267: 417-422.
  155. West AK, Stallings R, Hildebrand CE, Chiu R, Karin M, Richards RI. 1990. Human metallothionein genes: structure of the functional locus at 16q13. *Genomics.* 8(3):513-8.
  156. Winge, D.R. 1998. Copper-regulatory domain involved in gene expression. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 58:165-95.
  157. Yamada K, Kato H, Kanda N, Fujii-Kuriyama Y, Utakoji T, Itoh R. 1994. Sequence homology of Chinese hamster metallothionein genes I and II to those of the mouse and rat, and their amplification in Cd-resistant cells. *Biochim Biophys Acta.* 1219(3):581-91.
  158. Yamaguchi, Y., Heiny, M.E., Suzuki, M., Gitlin, J.D. 1996. Biochemical characterization and intracellular localization of the Menkes disease protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14030-14035.
  159. Yang MS, Lai KP, Cheng KY, Wong CK. 2000. Changes in endogenous Zn and Cu distribution in different cytosolic protein fractions in mouse liver after administration of a single sublethal dose of CdCl<sub>2</sub>. *Toxicology* 154(1-3):103-111.
  160. Yip, R., Johnson, C.J., Dallman, P.R. 1984. Age-related changes in laboratory values used in the diagnosis of anemia and iron deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 39:427-436.
  161. Yuan DS, Stearman R, Dancis A, Dunn T, Beeler T, Klausner RD. 1995. The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a

- ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. Proc Natl Acad Sci U S A. 92(7):2632-2636.
162. Zaitsev, V.N., Zaitseva, I., Papiz, M., Lindley, P.F. 1999. An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma. J. Biol. Inorg. Chem. 4: 579-87.
  163. Zar, J.H. 1984. in *Biostatistical analysis*, Prentice-Hall Englewood Cliffs, NJ, 2<sup>nd</sup> edn., pp 162-205
  164. Zhou, B. y Gitschier, J. 1997. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 7481-7486.
  165. Zhu, W.Y., Melera, P.W. 2001. Basal levels of metallothionein I and II expression in mouse embryo fibroblasts enhance growth in low folate through a cell cycle mediated pathway. Cell Biol. Int. 25(12): 1261-1269.