

UCH-FC  
DOC → BMCM  
E 101  
C. 1



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“MODIFICACIONES GÉNICAS DEL TRANSPORTE  
INTESTINAL DE HIERRO: OPORTUNIDADES EN EL  
TRATAMIENTO DE LA HEMOCROMATOSIS”**

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

**Eduardo Fernando Ezquer Romero**

Director de Tesis: Dr. Yedy Israel Jacard  
Codirector de Tesis: Dr. Marco Tulio Núñez



Abril de 2006

**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.

**Eduardo Fernando Ezquer Romero**

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 Celular, Molecular y Neurociencias en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 6 de abril de 2006.

**Directores de Tesis:**

Dr. Yedy Israel Jacard

Dr. Marco Tulio Núñez



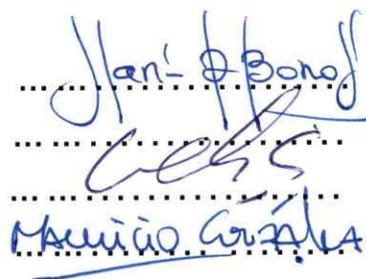
**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dra. María Rosa Bono

Dr. Daniel Wolf

Dr. Manuel Olivares

Dr. Mauricio González



*A mis abuelos*

*Enrique y Carmela  
Miguel y Teresa*



*A mis padres*

*Eduardo y Gladys*

*A Belén*



### **Resumen Bibliográfico**

Eduardo Fernando Ezquer Romero, nació en Mendoza, Argentina el 11 de noviembre de 1978. Cursó estudios básicos y medios en la Escuela Nacional de Comercio "Manuel Belgrano" y estudios superiores en la Universidad Nacional de San Luis, Argentina; en donde obtuvo el título de Licenciado en Biología Molecular en diciembre de 2001. En marzo del 2002 ingresó al programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Durante su participación en el mencionado programa de Doctorado recibió una beca del "Programa de Mejoramiento de la Calidad y Equidad de la Educación Superior" (MECESUP) y una beca de la Iniciativa Científica Milenio.

## *Agradecimientos*

*Mis más sinceros agradecimientos a quienes de algún modo hicieron posible el desarrollo de este trabajo de tesis, en especial:*

*Al Dr. Yedy Israel por su constante apoyo en la realización de este trabajo de tesis y por la confianza que me transmitió en todo momento.*

*Al Dr. Tulio Núñez por su permanente participación en la discusión de los resultados obtenidos y en el diseño de nuevas estrategias experimentales.*

*A la Dra. Amalia Sapag por su valiosa colaboración en el desarrollo e interpretación de los experimentos realizados, pero en especial por su preocupación por inculcar una formación científica y humana de excelencia.*

*Al Dr. Marcelo Ezquer por sus críticas constructivas en la redacción de la presente tesis y en los trabajos publicados a partir de la misma.*

*A mis compañeros del laboratorio de Farmacoterapia Génica: María Eliana Valdéz, Robel Vásquez, Giugliana Campos, Gabriel Cortínez, Paula Ocaranza, Lorena Lobos, Gonzalo Encina, Mario Rivera, Ginez González y Javier Wolnitzky por los buenos momentos compartidos durante el desarrollo de esta tesis.*

*A la colonia Argentina residente en Chile: Fernando, Mauricio, Melina, Alejandra, Germán y Roxana por los continuos asados para discutir temas científicos y no tan científicos.*



*A mis padres Eduardo y Gladys y a mis hermanos Marcelo, Analía, Cintia y Guillermo por su apoyo incondicional en todas las decisiones tomadas durante mi formación profesional.*

*Por último, por ser la más importante, a mi esposa Belén por creer en mi y porque siempre ha sido mi respaldo y apoyo en los buenos y malos momentos, por lo que considero que sin ella nada de esto hubiera sido posible.*



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Farmacoterapia Génica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile con fondos provenientes de:

- Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología.  
Proyecto ICM: P99-031-F
- Programa de Mejoramiento de la Calidad y la Equidad de la Educación Superior (MECESUP). Proyecto 12-02.
- Beca Postgrado Universidad de Chile PG 09-03 y PG 08-04.



## ÍNDICE GENERAL

|  |      |
|--|------|
| <b>Índice general</b>  | VI   |
| <b>Índice de figuras</b>   | VIII |
| <b>Abreviaturas</b>  | X    |
| <b>Resumen</b>   | XI   |
| <b>Summary</b>   | XV   |
| <b>Capítulo I: Introducción General</b>  | 1    |
| 1.1 Homeostasis corporal del hierro  | 2    |
| 1.2 Absorción intestinal del hierro  | 4    |
| 1.3 Transporte plasmático e incorporación de hierro a otros tejidos  | 6    |
| 1.4 Regulación de la absorción y metabolismo celular del hierro  | 9    |
| 1.5 Comunicación entre los sitios de absorción y almacenaje del metal  | 11   |
| 1.5.1 Modelo de acción propuesto para hepcidina  | 14   |
| 1.6 Hemocromatosis hereditaria   | 15   |
| 1.6.1 Mecanismos de acción propuestos para HFE   | 17   |
| 1.6.2 Hemocromatosis no relacionadas a HFE   | 19   |
| 1.6.3 Diagnóstico para la hemocromatosis hereditaria   | 20   |
| 1.6.4 Tratamiento actual para la hemocromatosis hereditaria  | 21   |
| <b>Materiales y Métodos</b>  | 23   |
| <b>Objetivos</b>   | 36   |
| <b>Primera parte: Mecanismos de regulación de la absorción intestinal de hierro y posibles tratamientos para la hemocromatosis hereditaria</b> | 39   |
| <b>Capítulo II: Mecanismos de regulación de la absorción de hierro en células intestinales</b>   | 40   |
| Introducción   | 40   |
| Resultados   | 43   |



|   |            |
|---|------------|
| Figuras   | 46         |
| Discusión   | 49         |
| <b>Capítulo III: Inhibición de la expresión de DMT-1 por AAV antisentido</b>  | <b>54</b>  |
| Introducción  | 54         |
| Resultados  | 59         |
| Figuras   | 65         |
| Discusión   | 71         |
| <b>Capítulo IV: Inhibición de la expresión de ferroportina por AAV antisentido</b>  | <b>77</b>  |
| Introducción  | 77         |
| Resultados  | 83         |
| Figuras   | 86         |
| Discusión   | 89         |
| <b>Segunda parte: Desarrollo de un nuevo sistema de corrección génica con posible utilidad en el tratamiento de la hemocromatosis hereditaria</b> | <b>92</b>  |
| <b>Capítulo V: Desarrollo de un nuevo sistema de corrección génica</b>  | <b>93</b>  |
| Introducción  | 93         |
| Resultados  | 98         |
| Figuras   | 106        |
| Discusión   | 116        |
| <b>Resumen y Conclusiones generales</b>   | <b>121</b> |
| <b>Bibliografía</b>   | <b>127</b> |
| <b>Anexo I</b>  | <b>140</b> |



## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo I: Introducción General

|            |    |
|------------|----|
| Figura 1.1 | 1  |
| Figura 1.2 | 3  |
| Figura 1.3 | 5  |
| Figura 1.4 | 8  |
| Figura 1.5 | 10 |
| Figura 1.6 | 13 |

### Capítulo II: Mecanismos de regulación de la absorción de hierro en células intestinales

|            |    |
|------------|----|
| Figura 2.1 | 46 |
| Figura 2.2 | 47 |
| Figura 2.3 | 48 |

### Capítulo III: Inhibición de la expresión de DMT-1 por AAV antisentido

|            |    |
|------------|----|
| Figura 3.1 | 65 |
| Figura 3.2 | 66 |
| Figura 3.3 | 67 |
| Figura 3.4 | 68 |
| Figura 3.5 | 69 |
| Figura 3.6 | 70 |

### Capítulo IV: Inhibición de la expresión de ferroportina por AAV antisentido

|            |    |
|------------|----|
| Figura 4.1 | 86 |
| Figura 4.2 | 87 |
| Figura 4.3 | 88 |



**Capítulo V:** Desarrollo de un nuevo sistema de corrección génica

|             |     |
|-------------|-----|
| Figura 5.1  | 106 |
| Figura 5.2  | 107 |
| Figura 5.3  | 108 |
| Figura 5.4  | 109 |
| Figura 5.5  | 110 |
| Figura 5.6  | 111 |
| Figura 5.7  | 112 |
| Figura 5.8  | 113 |
| Figura 5.9  | 114 |
| Figura 5.10 | 115 |



## ABREVIATURAS

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>AA:</b>             | ascorbato                              |
| <b>AAV:</b>            | virus adenoasociado                    |
| <b>AdV:</b>            | adenovirus                             |
| <b>As:</b>             | antisentido                            |
| <b>B<sub>2</sub>m:</b> | beta 2 microglobulina                  |
| <b>DHA:</b>            | dehidroascorbato                       |
| <b>DMEM:</b>           | medio de Eagle modificado por Dulbecco |
| <b>DMT-1:</b>          | transportador de metales divalentes 1  |
| <b>EDTA:</b>           | ácido etilendiaminotetracético         |
| <b>GSH:</b>            | glutación reducido                     |
| <b>GSSG:</b>           | glutación oxidado                      |
| <b>HH:</b>             | hemocromatosis hereditaria             |
| <b>IRE:</b>            | elemento respuesta al hierro           |
| <b>IRP 1:</b>          | proteína de respuesta al hierro 1      |
| <b>IRP 2:</b>          | proteína de respuesta al hierro 2      |
| <b>ITR:</b>            | repetición terminal invertida          |
| <b>MOI:</b>            | multiplicidad de infección             |
| <b>mRNA:</b>           | RNA mensajero                          |
| <b>n:</b>              | número de determinaciones              |
| <b>nt:</b>             | nucleótidos                            |
| <b>NTA:</b>            | ácido nitrilo acético                  |
| <b>pb:</b>             | pares de bases                         |
| <b>PBS:</b>            | tampón fosfato salino                  |
| <b>PCR:</b>            | reacción en cadena de la polimerasa    |
| <b>RT:</b>             | transcripción inversa                  |
| <b>SFB:</b>            | suero fetal de bovino                  |
| <b>TfR I:</b>          | receptor de transferrina I             |
| <b>TfR II:</b>         | receptor de transferrina II            |

## RESUMEN

El hierro es un elemento vital para todos los organismos vivos debido a su rol esencial en el centro catalítico de diversas reacciones biológicas. Sin embargo, en exceso, este metal es altamente tóxico debido a su capacidad de generar radicales libres que favorecen los procesos de peroxidación lipídica, daño proteico y modificación del DNA, resultando en un deterioro sistémico masivo.

En organismos superiores, el hierro ingresa desde el lumen intestinal al enterocito absortivo a través del transportador de metales divalentes DMT-1, presente en la membrana apical de estas células, y luego pasa al torrente sanguíneo a través del transportador basolateral ferroportina. Uno de los puntos de control más importantes en la homeostasis del hierro se produce en estas células intestinales, ya que ellas son capaces de responder a la concentración interna de hierro regulando la tasa de absorción del metal a través de la activación del sistema IRP/IRE (señal local). Por otro lado, se ha demostrado que el hígado también cumple un papel fundamental en el control de la absorción de hierro dietario mediante la secreción del péptido hepcidina, cuya expresión se correlaciona de forma inversa con la incorporación intestinal del metal (señal sistémica). La falla de alguno de estos mecanismos de control conduce a frecuentes patologías que se caracterizan por una alteración en la homeostasis del metal. Entre ellas se encuentra la hemocromatosis hereditaria, la enfermedad hereditaria más prevalente en la población de raza caucásica (con una frecuencia de 1:200). Esta patología se caracteriza por una alteración en el balance del hierro provocado por la excesiva absorción intestinal del metal, en relación al estado corporal del mismo. El exceso de hierro absorbido se deposita progresivamente en las

células parenquimales de varios tejidos, desencadenando patologías como cirrosis, carcinoma hepatocelular, pancreatitis y fallas cardíacas.

La mayoría de los pacientes que padecen de hemocromatosis hereditaria poseen una mutación inactivante en el gen que codifica para HFE, una proteína que normalmente actúa como inhibidor de la absorción intestinal de hierro, y cuya ausencia se correlaciona con un aumento en la expresión tanto del transportador apical de hierro DMT-1 como del transportador basolateral ferroportina.

El presente trabajo de tesis se divide en dos partes; en la primera parte se estudiaron los mecanismos de regulación de la incorporación intestinal de hierro mediado por hierro en células intestinales y se plantearon dos posibles alternativas terapéuticas para el tratamiento de la hemocromatosis hereditaria, mientras que en la segunda parte se diseñó y evaluó un nuevo sistema de modificación génica capaz de corregir o introducir mutaciones puntuales, con elevada eficiencia, en células de mamíferos.

**Primera parte:** Se estudió la regulación de la absorción de hierro mediada por hierro utilizando, como modelo de célula intestinal polarizada, a la línea celular Caco-2 cultivada tanto en insertos bicamerales como en placas de poliestireno. Sólo en células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales se observó una reducción en la incorporación apical de hierro al ser incubadas con altas concentraciones del metal, la que se correlacionó, a más largo plazo, con una reducción en los niveles de mRNA de los transportadores de hierro DMT-1 y ferroportina.

Se probaron dos alternativas terapéuticas basadas en la reducción de la expresión de los transportadores de hierro DMT-1 o ferroportina (ambos sobreexpresados en pacientes con hemocromatosis) como posible tratamiento de la hemocromatosis hereditaria. Para ello se utilizaron vectores virales adenoasociados

(AAV) portadores de genes antisentido dirigido contra el mRNA de estos transportadores, lográndose una inhibición en la incorporación apical de hierro del 55% y una inhibición en la transferencia basolateral del metal del 35% respectivamente. En ambos casos también se estudió el mecanismo de acción del gen antisentido generado, el efecto de la inhibición de estos transportadores en la expresión de otros genes relacionados con el metabolismo celular del hierro y el posible efecto tóxico asociado a la expresión de los genes antisentidos. Nuestros resultados sugieren que la inhibición de la expresión de DMT-1 sólo o en combinación con una inhibición de la expresión de ferroportina, mediante el uso de vectores virales portadores de genes antisentido, sería de gran valor en el futuro desarrollo de la primera terapia génica para el tratamiento de la hemocromatosis hereditaria.

**Segunda parte:** La corrección de mutaciones que generan enfermedades es uno de los máximos objetivos de la terapia génica. Los primeros estudios en este campo utilizaron moléculas quiméricas de RNA/DNA para corregir mutaciones puntuales; y si bien los resultados obtenidos fueron muy promisorios, estos no han podido ser reproducidos, llevando a la búsqueda de sistemas de corrección alternativos como es el uso de oligonucleótidos de cadena simple como molécula correctora. Estas moléculas son capaces de corregir mutaciones puntuales en células no seleccionadas con una eficiencia de 0,001 a 0,1 %. En este trabajo desarrollamos un nuevo sistema de corrección génica en el que moléculas de DNA de cadena simple, flanqueadas por repeticiones terminales invertidas del AAV son generadas a partir de un plasmidio en el interior de la célula que necesita ser corregida. La producción de las moléculas correctoras de cadena simple fue potenciada en presencia del gen *rep* del AAV y de los genes ayudantes del adenovirus. La frecuencia de corrección obtenida en células no seleccionadas fue al menos un orden de magnitud mayor a la que se logra con el uso

de oligonucleótidos sintéticos protegidos en los extremos con grupos fosforotioatos cuando el gen blanco (eGFP) se encuentra en forma episomal o integrado establemente en el genoma celular. En este trabajo se obtuvieron frecuencias de corrección que van de 1,1 a 4 % con sólo un tratamiento dependiendo de la fase del ciclo celular; y se demostró que la corrección génica ocurre por reparación del par anómalo y no por mecanismos de recombinación homóloga. Este nuevo sistema de corrección génica es fácil de realizar a través de técnicas de biología molecular estándares y tiene gran potencialidad tanto en la generación de modelos celulares de enfermedades genéticas como el de hemocromatosis hereditaria, como en el tratamiento de algunas enfermedades en la que una recuperación de sólo una pequeña parte del producto génico ya es suficiente para revertir el fenotipo de la enfermedad.

## SUMMARY

Iron is a vital element for all organisms. The electronic structure of its two oxidation states ( $\text{Fe}^{+2}$  and  $\text{Fe}^{+3}$ ) renders it the most versatile cofactor in biological redox reactions. However, in excess, unbound iron is highly toxic, due to its participation in the generation of free radical and reactive oxygen species. These molecules induce peroxidation of membrane lipids, protein damage and DNA modification leading to a massive systemic failure.

In mammals, iron is incorporated from the intestinal lumen into the duodenal enterocyte by the divalent metal transporter DMT-1 present on the apical membrane of these cells. Iron is further extruded into the blood by the basolateral transporter ferroportin. One of the most important checkpoint on iron homeostasis occurs in duodenal enterocytes, which respond to the internal iron concentration regulating the intestinal absorption rates by the action of the IRE/IRP system (local signal). Nevertheless, the liver can also play an important roll in the control of the intestinal iron absorption by the secretion of hepcidin, a peptide whose expression is inversely correlates with the intestinal iron absorption rates.

Alterations in iron homeostasis lead to frequent pathological disorders in humans. One of this is hereditary hemochromatosis (HH), the most prevalent inborn genetic disease (1:200 in Caucasians). The disease is characterized by over-absorption of dietary iron and an accelerated recycling of this metal by macrophages despite adequate iron stores. Iron accumulates mainly in the liver, pancreas and heart promoting cirrhosis, hepatocellular cancer, diabetes and cardiomyopathy.

Most HH patients are homozygous for an inactivating point mutation in the gene that codes for HFE, a protein that normally acts inhibiting the intestinal iron absorption

and whose absence is correlated with an increase in the expression of DMT-1 and ferroportin iron transporters.

This work is divided in two parts; in the first one we studied the mechanisms involved in the regulation of iron absorption in intestinal cells and we raised two gene therapeutic approaches in the treatment of hereditary hemochromatosis. In the second part we designed a new system of gene modification that is able to correct or introduce, with high efficiency, a point mutation in mammalian cells.

**First part:** We studied the regulation of iron absorption mediated by iron using Caco-2 cells as a model of polarized intestinal epithelial cell. These cells were cultured in bicameral inserts and in standard plastic plates. We observed a mark decrease in the apical iron absorption in cells pre-incubated with high iron concentration only when the cells were cultured in bicameral inserts. This inhibition correlated with a reduction in the DMT-1 and ferroportin mRNA levels at latter times.

We evaluated two gene therapy approaches in the treatment of hereditary hemochromatosis based in the reduction of the DMT-1 or ferroportin iron transporters (both over-expressed in HH patients) by the use of adenoassociated viral vectors (AAV) carrying an antisense gene against the mRNA of these transporters. With the use of this viral vector we achieved a 55 % inhibition in apical iron uptake and a 35 % reduction in basolateral iron efflux respectively. In both cases we also studied (i) the mechanisms of the antisense gene, (ii) the effect of the inhibition of these transporters in the expression of other genes related to the cellular metabolism of iron and (iii) the possible toxic effects associated to the antisense genes expression.

Studies presented herein indicate that enterocyte targeting with an AAV carrying a short antisense gene against DMT-1 alone or in combination with an AAV carrying an

antisense gene against ferroportin could have therapeutic potential in the treatment of hereditary hemochromatosis.

**Second part:** The efficient correction of deleterious mutations in cells and live animals is a highly sought goal in gene therapy. Promising initial studies in which an internally clamped chimeric DNA/RNA oligonucleotide guided the correction of single nucleotide mutations have been difficult to reproduce, leading to the use of synthetic single-stranded oligodeoxynucleotides which mediates the correction in unselected cells with an efficiency of 0.001 to 0.1 %. We present a novel approach in which single-stranded DNA molecules clamped by the inverted terminal repeats of the AAV virus are generated from a plasmid in the same cell in which the mutation needs to be corrected. The generation of single-stranded DNA is aided by the *rep* gene of AAV and the helper genes of adenovirus. Correction frequencies obtained for unselected cells were at least one order of magnitude higher than those achieved with phosphorothioate protected group when the target gene (eGFP) was either in episomal form or integrated in the genome. Corrections of 1.1 to 4.0 % were achieved depending on the stage of the cell cycle. We demonstrated that the correction occurs by repair of the anomalous base pair rather than via homologous recombination. The approach described here to correct single nucleotide mutations can be achieved by standard molecular biology techniques and could be of value in the generation of cell models of genetic diseases like hereditary hemochromatosis and may provide the means to restore gene function in some genetic disorders

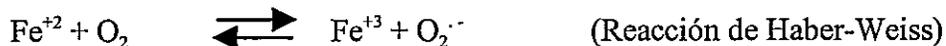
# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN GENERAL

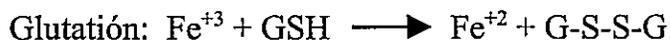
El hierro es un elemento vital para todos los organismos vivos. En mamíferos su función principal consiste en proveer un sitio de unión para el oxígeno en el grupo hemo de la hemoglobina (Ryter y Tyrrell 2000) pero además, puede unirse a proteínas en forma no hémica, principalmente en la forma de grupos de Fe-S, en metaloproteínas con importantes roles en los procesos de transferencia de electrones, regulación transcripcional, estabilización estructural y catálisis (Beinert y col. 1997).

Las funciones biológicas del hierro están basadas en sus propiedades químicas como la capacidad de formar distintos tipos de complejos de coordinación con ligandos orgánicos y su favorable potencial de óxido-reducción, que le permite actuar en reacciones biológicas como un cofactor muy versátil alternando, a pH neutro, entre la forma de Fe<sup>+2</sup> (ferroso) y Fe<sup>+3</sup> (férrico). Sin embargo, esta elevada reactividad, puede producir importantes daños a los sistemas biológicos. Cuando la capacidad de unión de hierro de las proteínas se satura, el exceso de hierro libre (no unido a proteína) puede promover la formación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno según las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss.

**Figura 1.1: Generación de radicales libres catalizada por hierro**



Fe<sup>+3</sup> es reducido a Fe<sup>+2</sup> por los reductores celulares:



*Generación de especies reactivas del oxígeno catalizadas por hierro (reacción de Fenton y reacción de Haber-Weiss). El  $Fe^{+3}$  generado en el interior celular es rápidamente reducido a  $Fe^{+2}$  por los reductores celulares ascorbato y glutatión.*

---

Los radicales libres son especies altamente reactivas capaces de promover la oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos de membrana y modificación de ácidos nucleicos, provocando una degradación tisular acelerada (Andrews y Levy 1998). Por este motivo el contenido corporal de hierro debe ser mantenido entre límites muy estrechos, proporcionando la cantidad de hierro suficiente para la síntesis de las metaloproteínas esenciales, pero evitando los posibles efectos tóxicos de la sobrecarga del metal.

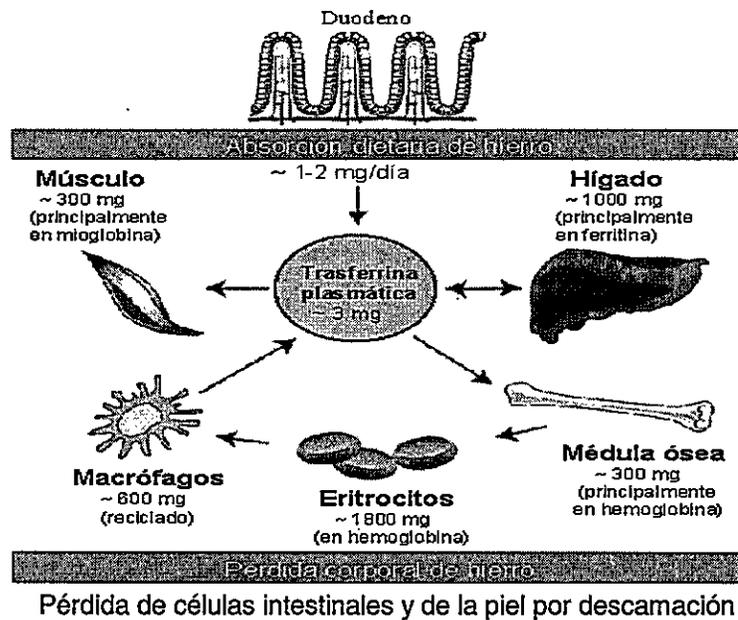
### **1.1 Homeostasis corporal del hierro**

El cuerpo humano adulto contiene de 3 a 5 g de hierro (45-55 mg/kg). El 60-70 % de este metal se presenta unido a la hemoglobina en los glóbulos rojos circulantes, mientras que el resto se encuentra en el hígado, almacenado en hepatocitos y macrófagos y en el músculo, formando parte de la proteína almacenadora de oxígeno mioglobina (Andrews 1999; Ponka 1997).

No existe ningún sistema fisiológico para la eliminación de este metal una vez que ha sido absorbido, por lo que en mamíferos, la economía corporal del hierro se basa en la reutilización del mismo. Sólo 1/2000 parte del hierro total (1-2 mg) es reemplazado diariamente por el hierro absorbido en la dieta, compensando la pérdida no específica de hierro por descamación de las células intestinales y de las células de la piel, y en menor grado por la eliminación del metal en la bilis (Conrad y Umbreit 2000). La mayor parte del hierro necesario para el proceso de eritropoiesis (20-25 mg

diarios) provienen del reciclado del hierro corporal, a través de la acción de un grupo especializado de macrófagos tisulares encargados de fagocitar enterocitos dañados o senescentes y liberar su hierro hacia la circulación general (Deiss 1983).

**Figura 1.2: Distribución corporal del hierro**



*El hombre adulto posee una masa total de hierro de aproximadamente 4 g. La mayor parte se encuentra unida a la hemoglobina de los eritrocitos (1,8 g), cerca de 1 g se encuentra como reserva, almacenado en el hígado unido principalmente a ferritina y el resto (0,6 g) se encuentra en músculo, unido a mioglobina y en la médula ósea. Los macrófagos reciclan continuamente el hierro de enterocitos dañados o senescentes y lo devuelven a la circulación general conformando un mecanismo cerrado en donde la absorción dietaria de hierro se contrarresta con la pérdida no específica del metal en los procesos normales de descamación celular.*

## 1.2 Absorción intestinal de hierro

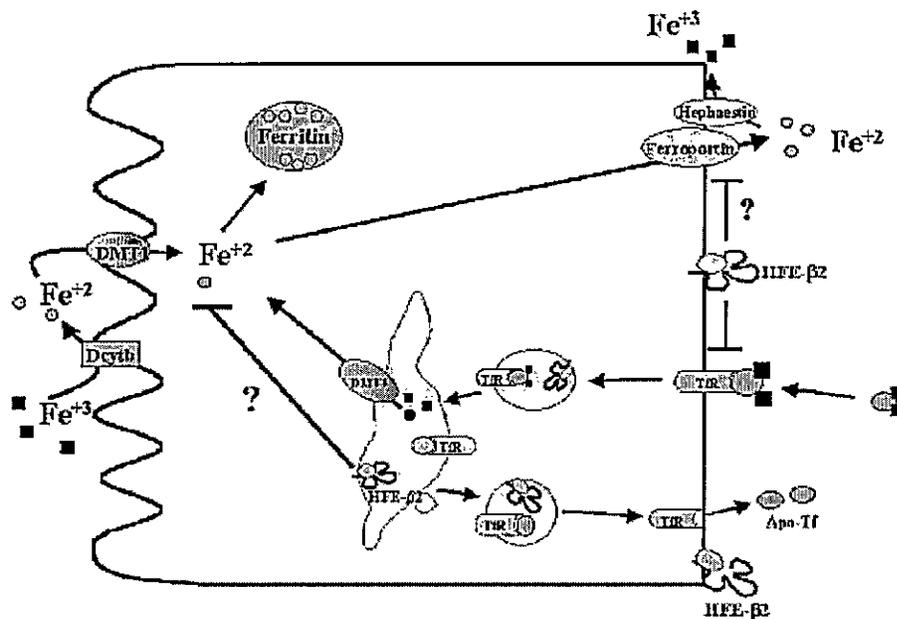
La absorción intestinal de hierro es un proceso complejo que depende de la función coordinada de proteínas codificadas por un gran número de genes. De los 15 mg de hierro iónico y hémico normalmente presentes en la dieta sólo 1 a 2 mg son absorbidos diariamente. Esta función es realizada por los enterocitos absortivos duodenales, un grupo específico de células diferenciadas que poseen una membrana apical (luminal) con gran cantidad de microvellosidades lo que aumenta enormemente el área de absorción.

En la dieta, el hierro iónico se encuentra en su forma oxidada. Este compuesto es altamente insoluble, por lo que para ser absorbido por el intestino debe ser solubilizado y quelado por el pH ácido del estómago. Previo a su incorporación por el enterocito, el  $\text{Fe}^{+3}$  es reducido a  $\text{Fe}^{+2}$  (forma absorbible) por acción de la reductasa férrica DcytB presente en la membrana apical de estas células (McKie y col. 2001), posteriormente el  $\text{Fe}^{+2}$  ingresa al enterocito por medio del transportador de metales divalentes **DMT-1**, una proteína de 561 aminoácidos formada por 12 segmentos transmembrana, fuertemente expresada en la membrana apical del enterocito pero también, aunque en menor nivel, en otros tejidos (Gunshin y col. 1997). El transportador DMT-1 también ha sido implicado en el transporte de otros cationes divalentes como cobre, cobalto, manganeso, cadmio y plomo (Fleming y col. 1997; Gunshin y col. 1997). La importancia de este transportador en la incorporación de hierro ha quedado claramente demostrada por estudios en ratones *mk<sup>-/-</sup>* y ratas Belgrade b. Ambos modelos experimentales poseen una mutación puntual en el gen que codifica para DMT-1, lo que conduce a una inhibición de la incorporación intestinal de hierro y al desarrollo de anemia microcítica (Fleming y col. 1997; Fleming y col.

1998), sugiriendo que este transportador es la principal vía de incorporación de hierro iónico en las células intestinales.

Una vez incorporado al enterocito el hierro puede seguir dos destinos: (i) ser almacenado mediante la unión a proteínas como ferritina para su posterior eliminación en el proceso normal de descamación intestinal o (ii) pasar a la circulación general y ser distribuido al resto de las células del organismo, mediante un proceso de exotransporte mediado por el transportador **ferroportina**, presente en la membrana basolateral del enterocito (Donovan y col. 2000), y acoplado a la reoxidación del  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  por acción de la oxidasa de membrana hefestina y por la proteína plasmática ceruloplasmina (Vulpe y col. 1999).

**Figura 1.3: Modelo propuesto para la absorción de hierro iónico por el enterocito**



Adaptado de Ezquer y col Biological Research 38:71 2005

*El  $\text{Fe}^{+3}$  es reducido a  $\text{Fe}^{+2}$  en el lumen intestinal por la acción de la reductasa DcytB y transportado a través de la membrana apical por el transportador de metales*

*divalentes DMT-1. En el enterocito el hierro puede ser almacenado por unión a ferritina o ser exportado a través de la membrana basolateral por el transportador de hierro ferroportina. El  $Fe^{+2}$  exportado es convertido a  $Fe^{+3}$  por la oxidasa de membrana hefestina y la proteína plasmática ceruloplasmina y es unido a transferrina para su distribución al resto de los tejidos. El enterocito puede también incorporar hierro iónico desde el plasma a través del receptor de transferrina I.*

---

Si bien la absorción de hierro por acción de DMT-1 es considerada como la principal vía de entrada de este metal al enterocito absorbivo, también se ha implicado a la vía integrina-mobilferrina en la incorporación de hierro iónico, en la forma de  $Fe^{+3}$ , en células intestinales (Conrad y col. 2000); sin embargo, este sistema de incorporación no ha sido completamente caracterizado.

El enterocito absorbivo también tiene la capacidad de absorber el hierro hémico presente en la dieta, el que al ser soluble a pH intestinal (pH 6) presenta una mayor biodisponibilidad que la forma iónica, siendo absorbido con gran facilidad por las células intestinales (Carpenter y Mahoney 1992). Recientemente se logró identificar a la proteína HCP-1 como el principal transportador del hierro hémico en células intestinales (Shayeghi y col. 2005). Se ha postulado que una vez incorporado al enterocito el hierro iónico sería liberado enzimáticamente por una oxigenasa hémica y luego seguiría el mismo destino del hierro iónico (Follett y col. 2002).

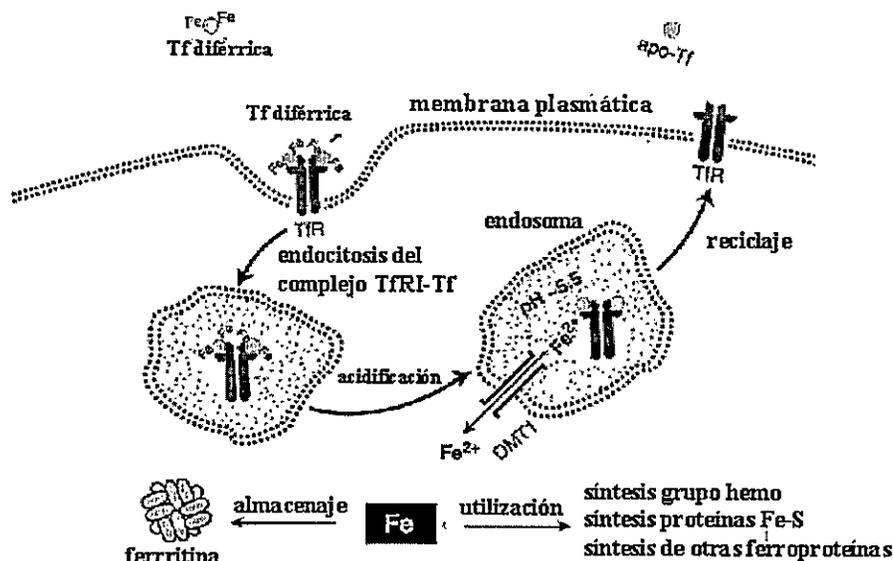
### **1.3 Transporte plasmático e incorporación de hierro a otros tejidos**

Una vez absorbido, el hierro debe ser transportado por el torrente sanguíneo para que junto con el hierro reciclado por los macrófagos sea distribuido al resto de las células del organismo. Este proceso es realizado por la proteína transferrina, una molécula muy abundante en el plasma, capaz de unir 2 átomos de  $Fe^{+3}$ , facilitando su

transporte al mantener al metal en forma soluble a pH neutro y previniendo la toxicidad inducida por la generación de radicales libres. El porcentaje normal de saturación de transferrina en la sangre es del 30-40 %; sin embargo, cuando la transferrina se satura (episodios de elevada absorción) el exceso de hierro no unido a la proteína es rápidamente capturado por los hepatocitos, convirtiendo al hígado en el principal órgano de almacenaje de este metal (Andrews y Levy 1998).

En células no enterocíticas la incorporación del hierro es mediada principalmente por el receptor de transferrina I (TfRI) mediante un proceso conocido como "el ciclo de la transferrina". El receptor de transferrina I está presente en casi todas las células de mamíferos y se encuentra sobreexpresado en aquellas células con alta demanda de hierro como son linfocitos activados y precursores eritroides (Andrews 2005). El proceso de captación del hierro plasmático se inicia cuando el complejo transferrina-hierro se une, con alta afinidad, a TfRI presente en la superficie celular (Hentze y col. 2004). Este complejo es posteriormente endocitado por un mecanismo dependiente de clatrina, formando un endosoma, que al acidificarse, produce un cambio conformacional en el complejo transferrina-TfRI que lleva a la liberación del hierro unido a la transferrina. El hierro liberado es rápidamente reducido y posteriormente transportado desde el endosoma hacia el citoplasma por acción del transportador de metales divalentes DMT-1, presente en la membrana endosomal (Sipe y Murphy 1991; Fleming y col. 1998). Tanto la transferrina vacía como TfRI vuelven a la superficie celular en donde se disocian a pH neutro y quedan disponibles para ser reutilizados.

**Figura 1.4 Absorción de hierro mediada por el receptor de transferrina I**



Adaptado de Walker y col Int Rev Cytol 211:241 2001

El  $Fe^{+3}$  en la circulación se une rápidamente a la apotransferrina. La transferrina unida a dos moléculas de hierro (transferrina diférrica) se asocia luego a TfRI en la superficie celular y el complejo es posteriormente endocitado. Cuando se produce la acidificación del endosoma el hierro es liberado del complejo, reducido a  $Fe^{+2}$  y posteriormente transportado hacia el citoplasma a través de DMT-1. TfRI y apotransferrina son reciclados hacia la membrana celular en donde la apotransferrina es liberada para su reutilización. Tf-diférrica: transferrina diférrica; TfRI: receptor de transferrina I

Esta es una vía de incorporación de hierro de gran importancia tanto en el individuo adulto, como en el desarrollo embrionario, ya que se ha observado que ratones knockout para TfRI mueren en etapas tempranas de la embriogénesis debido a episodios de anemia severa (Levy y col. 1999a). El exceso de hierro incorporado por esta vía es rápidamente detoxificado por su unión a ferritina, una proteína de almacenaje constituida por 24 subunidades que se ensamblan formando una cavidad con capacidad de unión de hasta 4500 moléculas de hierro (Harrison y Arosio 1996).

#### **1.4 Regulación de la absorción y metabolismo celular del hierro**

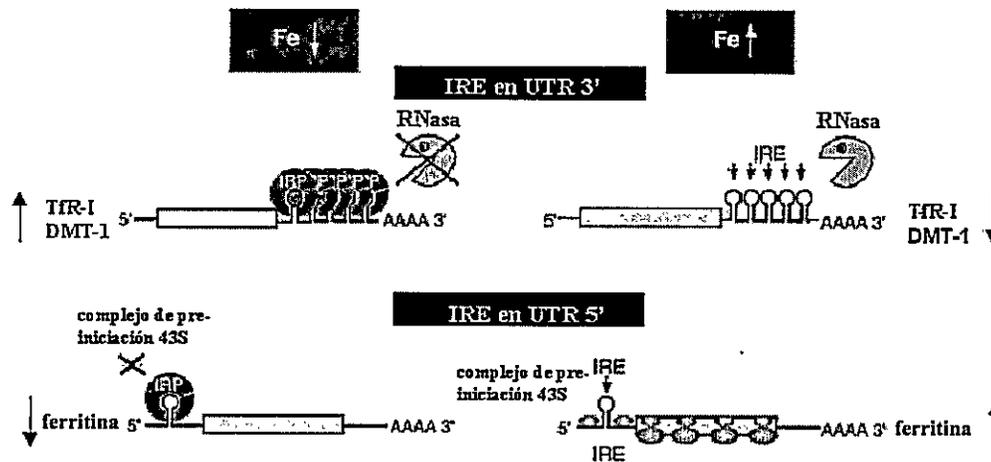
Como se mencionó anteriormente, los mamíferos no poseen ninguna vía fisiológica destinada a la excreción de hierro, por lo que los principales mecanismos de regulación actúan a nivel de la absorción del hierro, lo que evita una sobrecarga corporal del metal.

El control de la absorción intestinal de hierro esta dado por la acción concertada de varios mecanismos de regulación que responden tanto a señales locales, generadas en las células absortivas, como a señales generadas en forma sistémica. Uno de los mecanismos de regulación local esta dado por la acción de las proteínas respondedoras al hierro IRP-1 e IRP-2 que funcionan como sensores intracelulares del metal. Estas son proteínas citosólicas que se unen a pequeños dominios estructurales con forma de tallo de aproximadamente 30 nucleótidos (elementos respuesta al hierro IRE), presentes en el mRNA de varias de las proteínas involucradas en la homeostasis celular del metal (Hentze y col. 2004; Pantopoulos 2004).

En condiciones de carencia celular de hierro el sistema IRP/IRE se activa, conduciendo a un aumento en la expresión de proteínas que poseen elementos respuestas IRE en la región 3' no traducida de sus mRNA (como es el caso de TfRI y de una de las isoformas del transportador DMT-1), por aumento en la estabilidad de los mismos. Por el contrario, aquellos mRNA que poseen elementos IRE en sus regiones 5' no traducidas (como es el caso de la proteína de almacenaje de hierro ferritina) disminuyen su expresión, ya que en este caso la interacción IRP/IRE produce un bloqueo de la unión del ribosoma al mRNA, impidiendo su traducción (vide infra para localización de IRE en ferroportina). En situaciones de sobrecarga de hierro citoplasmático se observa un fenotipo opuesto al antes mencionado, en donde el

sistema IRP/IRE se desactiva provocando una disminución de la expresión de las proteínas encargadas de captar hierro (TfRI y DMT-1) y un aumento en la expresión de proteínas encargadas de su almacenaje y detoxificación (ferritina), constituyendo un equilibrio finamente regulado entre las necesidades internas de hierro y la absorción de este metal (Eisenstein y Ross 2003).

**Figura 1.5: Regulación de la absorción de hierro mediada por el sistema IRE/IRP**



Adaptado de Papanikolaou y col. Toxicol Appl Pharmacol 202:199 2005

Una disminución en la concentración intracelular de hierro activa la unión de las proteínas IRP a los elementos IRE. Esta unión resulta en la estabilización del mRNA del receptor de transferrina I (TfRI) y de una de las isoformas del transportador de metales divalentes DMT-1 (por protección de RNasas) y en la inhibición traduccional de los mRNA de las cadenas H y L de ferritina (por bloqueo de la unión del complejo de preiniciación 43 S). Por el contrario, en condiciones de exceso de hierro celular, las proteínas IRP no se unen a los elementos IRE permitiendo la degradación de mRNA de TfRI y DMT-1 y la traducción de ferritina. IRP: proteína de respuesta al hierro; IRE: elemento respuesta al hierro.

En el enterocito absortivo la fase de captura apical y la fase de transferencia basolateral de hierro parecen estar reguladas en forma coordinada, ya que tanto la expresión de DMT-1 como la de ferroportina están igualmente relacionadas a los niveles corporales de hierro. Ambas proteínas se encuentran sobreexpresadas en condiciones de deficiencia corporal de hierro y disminuidas en condiciones de sobrecarga del metal (Rolf's y col. 2002).

A diferencia del mRNA de DMT-1 el mRNA de ferroportina posee un elemento IRE en su región 5' no traducida, que debería conferirle una regulación contraria a la observada en células intestinales. El hecho de que este elemento IRE se encuentre a una distancia mayor a la normal con respecto al punto de inicio de la transcripción (Eisenstein y Ross 2003), y que la expresión de ferroportina no sufra claras modificaciones al aumentar la concentración de hierro dietario ha llevado a postular que este elemento IRE en la región 5' no traducida de ferroportina no sería un elemento funcional (Frazer y col. 2003). Sin embargo, la expresión de ferroportina si se ve reducida por una sobrecarga sistémica de hierro, sugiriendo que este transportador responde a otros tipos de señales regulatorias, distintas a la generada por la acción del sistema IRP/IRE en el enterocito absortivo (Gehrke y col. 2003).

### **1.5 Comunicación entre los sitios de absorción y almacenaje de hierro**

Se han descrito varios fenómenos capaces de afectar la absorción de hierro por del enterocito maduro, entre ellos se ha observado que tanto condiciones de escasez de hierro como de eritropoiesis acelerada e hipoxia, producen un aumento en la absorción intestinal del metal, mientras que situaciones de sobrecarga de hierro e inflamación provocan una reducción en la absorción intestinal del metal (Nelson 1999). Sin embargo, las señales sistémicas encargadas de transmitir estos acontecimientos al

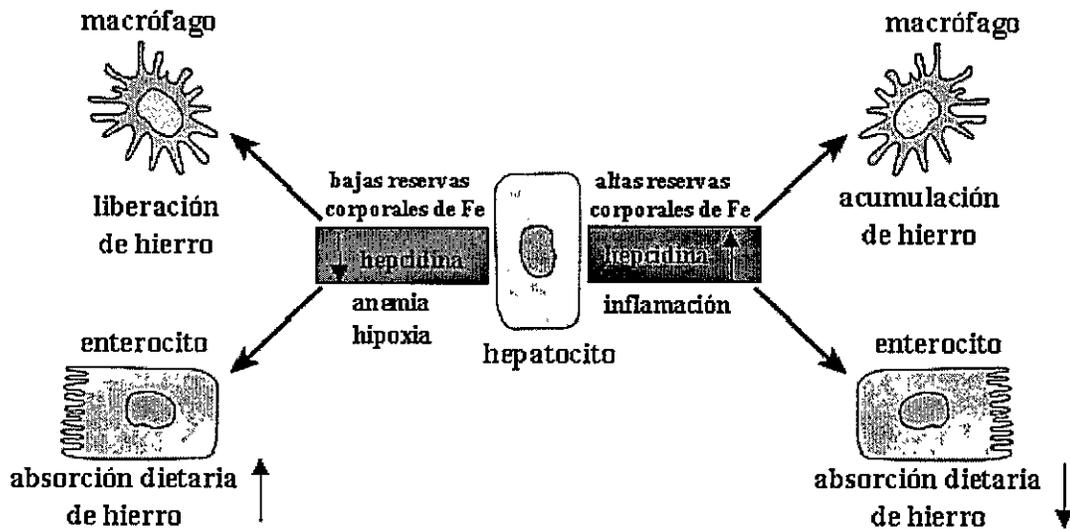
enterocito para que este module su actividad absortiva han permanecido evasivas por mucho tiempo.

Recientemente se ha sugerido un posible vínculo entre los requerimientos corporales de hierro y la expresión de sus transportadores a nivel intestinal (Ganz 2003). Esta conexión se produjo con la identificación de hepcidina, un péptido con propiedades antimicrobianas encontrado en sangre y orina (Park y col. 2001; Pigeon y col. 2001) que se expresa principalmente en el hígado en la forma de un pro-péptido de 84 aminoácidos y que es luego procesado y secretado a la circulación sanguínea como un péptido de 25 aminoácidos rico en puentes disulfuros (Pigeon y col. 2001).

Tanto el aumento del contenido de hierro hepático (Park y col. 2001; Pigeon y col. 2001; Ilyin y col. 2003) como estímulos inflamatorios (Nicolas y col. 2002b; Nemeth y col. 2004) producen un aumento en los niveles de mRNA de hepcidina en el hígado, mientras que una disminución del nivel de hierro hepático o episodios de hipoxia conducen a una disminución de igual magnitud en su expresión y niveles (Frazer y col. 2002; Nicolas y col. 2002b). Estos cambios en la expresión de hepcidina se correlacionan temporalmente y en forma inversa con la expresión génica y niveles de los transportadores DMT-1 y ferroportina en el enterocito (Frazer y col. 2002). Estas observaciones han llevado a postular a la hepcidina como el factor humoral que relaciona el nivel corporal de hierro con el grado de absorción del metal por el intestino (Frazer y Anderson 2003). Esta hipótesis ha sido reforzada por experimentos en los que se generaron ratones knockout para hepcidina, estos animales desarrollaron un fenotipo de absorción intestinal de hierro exacerbado acompañado de una progresiva sobrecarga de hierro a nivel hepático, (Nicolas y col. 2001). Por el contrario, ratones transgénicos que sobreexpresan hepcidina en el hígado, con un promotor no regulable,

nacen con deficiencias severas de hierro, sugiriendo que hepcidina además de bloquear el transporte intestinal del metal, afecta también el transporte de hierro a través de la placenta (Nicolas y col. 2002a).

**Figura 1.6: Modelo propuesto para la acción reguladora de hepcidina**



Adaptado de Papanikolaou y col. Toxicol Appl Pharmacol 202:199 2005

*Estímulos como una disminución en la reserva corporal de hierro, anemia o hipoxia producen una caída en la secreción hepática de hepcidina, la que lleva a un aumento en la absorción intestinal de hierro y en la liberación del metal por los macrófagos. Estímulos como una alta reserva corporal de hierro o procesos de inflamación producen un aumento de la secreción hepática de hepcidina que lleva a una disminución de la absorción intestinal de hierro y a un aumento en la retención de este metal por los macrófagos.*

### **1.5.1 Modelo de acción propuesto para hepcidina**

En el modelo actual, los hepatocitos tienen un papel central en la regulación de la absorción de hierro por el intestino, siendo capaces de medir el nivel de saturación de la transferrina circulante, presumiblemente a través de la acción de TfRI o TfRII, y modular de acuerdo a este la expresión de hepcidina (Camaschella y col. 2000; Frazer y Anderson 2003). Cuando las reservas corporales de hierro están elevadas el hígado produce y secreta hepcidina, que llega al intestino por el torrente sanguíneo; allí hepcidina interactuaría directamente con el transportador ferroportina induciendo su internalización y degradación, provocando una reducción de la salida de hierro desde el enterocito al plasma (Nemeth y col. 2006). Se ha propuesto que el bloqueo de la salida de hierro por hepcidina resultaría en un aumento en la concentración de este metal en el enterocito, lo que llevaría, por acción del sistema IRP/IRE, a una disminución de la incorporación apical de hierro por reducción de la expresión del transportador DMT-1 (Frazer y col. 2002; Frazer y col. 2003). Cuando las reservas de hierro son escasas, la producción de hepcidina disminuye y el transportador ferroportina regresa a la membrana basolateral del enterocito para participar en la salida de hierro hacia el torrente sanguíneo. Este mismo fenómeno de regulación ha sido propuesto también para la salida del hierro reciclado desde los macrófagos, sugiriendo que hepcidina actuaría como un regulador negativo de (i) la absorción intestinal de hierro, (ii) del transporte de hierro a través de la placenta y (iii) del reciclaje de hierro por los macrófagos.

## **1.6 Hemocromatosis Hereditaria**

El desbalance en los procesos de regulación de la homeostasis corporal del hierro conduce a frecuentes patologías en humanos (Trinder y col. 2002), entre estas se encuentra la hemocromatosis hereditaria (HH), la enfermedad autosómica recesiva más prevalente en la población de raza caucásica, con una frecuencia estimada de 1:200 (individuos homocigotos) (Edwards y col. 1988). Sólo en Estados Unidos, más de un millón de personas están afectadas por esta enfermedad (Levy y col. 1999b), excediendo ampliamente la suma de las prevalencias de enfermedades de alto impacto como son la fibrosis quística y la distrofia muscular (Bacon y col. 1999).

Esta enfermedad se caracteriza por un aumento en la absorción intestinal de hierro y por un acelerado reciclaje del metal por parte de los macrófagos. El exceso de hierro circulante se deposita progresivamente en las células parenquimales de diversos órganos como el hígado, corazón y páncreas (Bomford 2002). En promedio las personas sanas absorben de 1 a 2 mg de hierro por día mientras que las que padecen de HH absorben de 8 a 10 mg de hierro diario (Smith y col. 1969).

La enfermedad se caracteriza por presentar inicialmente síntomas no específicos como fatigas prolongadas, artropatías e hiperpigmentación de la piel, pero posteriormente, el exceso de hierro conduce a la falla progresiva de varios órganos, desencadenando patologías como hipogonadismo, cardiomiopatías, diabetes, hepatomas, y cirrosis (Olynyk y col. 1999). Debido a que la sobrecarga de hierro es acumulativa los efectos severos de la enfermedad aparecen usualmente en la edad adulta, después de décadas de progresiva sobrecarga del metal.

En el año 1996 Feder y colaboradores identificaron, por técnicas de clonamiento posicional, el gen responsable de la enfermedad (Feder y col. 1996). Este

gen codifica para una proteína transmembrana de 343 residuos, llamada HFE, perteneciente a la familia de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I con capacidad de unión a la proteína  $\beta$ 2-microglobulina. En el 85 % de los pacientes con HH se han identificado dos mutaciones puntuales independientes en el gen que codifica para HFE (Philpott 2002). La mayoría los individuos que presentan síntomas clínicos de la enfermedad son homocigotos para la mutación Cys282Tyr, que produce la pérdida de una cisteína involucrada en la formación de un puente disulfuro en la proteína, llevando a la pérdida de la capacidad de HFE de asociarse con la proteína  $\beta$ 2-microglobulina (Feder y col. 1996). Esta interacción es fundamental para el procesamiento y expresión de HFE en la superficie celular, por lo que la mutación Cys282Tyr provoca la retención de HFE en el retículo endoplásmico y su rápida degradación con la consiguiente reducción de su abundancia en la superficie celular (Waheed y col. 1997). La otra mutación en HFE en pacientes con HH involucra el cambio His63Asp, pero a diferencia de la mutación anterior, su efecto no ha sido completamente dilucidado.

No todos los individuos que poseen estas mutaciones desarrollan la enfermedad, por lo que se ha propuesto una penetrancia incompleta para ellas (Beutler y col. 2002). Asimismo, también se han identificado individuos que desarrollan la enfermedad pero no poseen mutaciones en el gen *HFE*, lo que hace suponer que en la enfermedad están implicados otros factores génicos adicionales a las mutaciones anteriormente descritas (Carella y col. 1997; Olynyk y col. 1999).

### **1.6.1 Mecanismos de acción propuestos para HFE**

En mamíferos, la proteína HFE presenta bajos niveles de expresión en la mayoría de los tejidos (Feder y col. 1996); sin embargo, esta tiene una distribución especial en el intestino, en donde es altamente expresada por los enterocitos de la cripta (Waheed y col. 1999). HFE también se expresa fuertemente en el hígado, principalmente en los hepatocitos (Holmstrom y col. 2003; Zhang y col. 2004) y células de Kuffer (Bastin y col. 1998) y en la placenta (Parkkila y col. 1997). Aunque hasta el momento se desconoce la función exacta de la proteína HFE, se ha postulado que ella estaría involucrada en la regulación del mecanismo sensor del nivel corporal de hierro. Esta afirmación se basa en experimentos en los que se generaron ratones knockout para HFE o en los que se introdujo la mutación puntual Cys282Tyr responsable de la enfermedad (Zhou y col. 1998; Bahram y col. 1999). Estos animales desarrollaron un pronunciado aumento en la tasa de absorción intestinal de hierro, un elevado porcentaje de saturación de transferrina y un gran número de síntomas característicos de la hemocromatosis hereditaria.

Tanto el transportador apical DMT-1 como el transportador basolateral ferroportina se encuentran claramente sobreexpresados en los enterocitos de pacientes que padecen de HH y en los enterocitos de los ratones knockout para HFE, lo ha llevado a postular que la proteína HFE podría controlar tanto la fase de incorporación apical como la fase de transferencia basolateral de hierro (Arredondo y col. 2001). Núñez y colaboradores han demostrado que la sobreexpresión de HFE silvestre en células intestinales Caco-2 provoca una inhibición de la incorporación apical de hierro, por lo que HFE actuaría como un regulador negativo de la actividad de DMT-1 (Arredondo y col. 2001; Arredondo y col. 2003). De hecho, el mismo grupo

encontró que la proteína HFE, presente normalmente en la membrana basolateral del enterocito puede también encontrarse en aposición a DMT-1 en la membrana apical, lo que podría interpretarse como una indicación de un efecto adicional de HFE sobre DMT-1 que fuera independiente del sistema IRP/IRE. En los pacientes que padecen de HH, las mutaciones descritas en HFE afectarían este mecanismo inhibitorio. Otros investigadores han vinculado a HFE con una actividad inhibitoria sobre el transportador basolateral ferroportina, limitando así la salida del hierro incorporado por el enterocito hacia la circulación sanguínea cuando la concentración corporal del metal es elevada. En este caso, las mutaciones en HFE le impediría cumplir esta función generando enterocitos con un transporte transepitelial de hierro exacerbado (Townsend y Drakesmith 2002).

Aunque normalmente la expresión de hepcidina es alta durante una sobrecarga de hierro hepático, en pacientes con hemocromatosis hereditaria, al igual que en los ratones knockout para HFE, se detectan niveles inapropiadamente bajos de esta proteína, lo que sugiere que un HFE normal también es necesario para la producción de hepcidina hepática (Ahmad y col. 2002). Recientemente se demostró que la cruce de ratones knockout para HFE con ratones transgénicos que sobreexpresan hepcidina bajo el control de un promotor no regulable, genera una descendencia de animales que no presenta signos de una absorción exacerbada de hierro, indicando que hepcidina contrarresta el desarrollo de hemocromatosis hereditaria causada por mutaciones en HFE (Nicolas y col. 2003). Estos datos, junto al hecho de que tanto HFE como hepcidina se expresan fuertemente en el hígado, y que la ausencia de cualquiera de ellos genera un fenotipo de hemocromatosis ha llevado a otros investigadores a postular que el principal sitio de acción de HFE sería a nivel

hepático (Frazer y col. 2002; Frazer y Anderson 2003; Nicolas y col. 2003). En este modelo HFE regularía la expresión de hepcidina en respuesta a cambios en las reservas corporales de hierro, probablemente a través de una competencia entre HFE y transferrina diférrica por unión a un sitio común en TfRI (Lebron y col. 1999; Salter-Cid y col. 1999). En pacientes con HH, la pérdida de la función de HFE impediría la inducción de la expresión de hepcidina, sin importar que las reservas corporales de hierro se encuentren elevadas. Al producirse cantidades reducidas de hepcidina esta no podría actuar como señal sistémica para disminuir el nivel de absorción de hierro por el enterocito, conduciendo a una progresiva sobrecarga corporal del metal. De esta forma, la falta de una señal inhibitoria proveniente del hígado contribuiría al aumento en la absorción intestinal de hierro observado en la enfermedad.

#### **1.6.2 Hemocromatosis no relacionadas a HFE**

El clonamiento del gen *HFE* abrió el camino para la identificación de otras formas de hemocromatosis hereditaria no relacionadas a HFE mediante el reconocimiento de mutaciones en otros genes implicados en el metabolismo del hierro. Ejemplos de hemocromatosis no relacionadas a HFE son: (i) hemocromatosis juvenil (o hemocromatosis tipo II), una enfermedad autosómica recesiva producida por mutaciones en los genes que codifican para hepcidina o para hemojubilina, una proteína recientemente identificada e implicada en la misma vía de regulación de hierro que hepcidina (Roetto y col. 2003; Papanikolaou y col. 2004). Esta es una forma de hemocromatosis muy severa, caracterizada por una rápida acumulación del hierro que conduce a un daño sistémico masivo, usualmente antes de la tercera década de vida; (ii) hemocromatosis hereditaria tipo III, esta es una forma de hemocromatosis muy rara causada por una mutación en el gen que codifica para el receptor de transferrina II

(Camaschella y col. 2000), una proteína fuertemente expresada en el hígado pero cuya función no es aún completamente conocida debido a que su expresión no es regulada por hierro y a que tiene una afinidad por transferrina mucho mas baja que la del receptor de transferrina I (Kawabata y col. 1999); (iii) hemocromatosis tipo IV, a diferencia de las anteriores, esta es una forma de sobrecarga de hierro autosómica dominante y se asocia a mutaciones en el gen que codifica para el transportador ferroportina (Montosi y col. 2001; Njajou y col. 2001). Esta variante se caracteriza por un elevado nivel de ferritina sérica pero el porcentaje de saturación de transferrina es normal, con una deposición principal de hierro en las células de Kuffer y no en hepatocitos. Sin embargo, las características básicas compartidas por todas estas formas de sobrecarga de hierro indican que ellas son sólo variantes genéticas de un mismo síndrome.

### **1.6.3 Diagnóstico para la hemocromatosis hereditaria**

En la actualidad, debido a la baja penetrancia de la enfermedad, existe una gran controversia sobre la utilidad de aplicar una búsqueda genética masiva para la detección de individuos portadores de la mutación Cys282Tyr en el gen *HFE* en poblaciones de alto riesgo.

En general, los estudio séricos son una herramienta muy útil para el diagnostico en individuos que poseen síntomas no específicos de la enfermedad como debilidad, fatiga, hiperpigmentación o impotencia; en estos casos la determinación del porcentaje de saturación de transferrina es considerada como el análisis más fácil y útil como una primera aproximación al diagnostico de hemocromatosis, en donde un porcentaje de saturación de transferrina mayor al 60 % en hombres y mayor al 50 % en mujeres es

considerado como un marcador de sobrecarga de hierro y es un claro indicador para la realización de un análisis genético.

#### **1.6.4 Tratamiento actual para la hemocromatosis hereditaria**

Debido a que la HH es usualmente diagnosticada después de la aparición de los signos clínicos de la enfermedad (en la cuarta o quinta década de vida) los pacientes generalmente presentan una sobrecarga de hierro muy elevada al momento del diagnóstico.

Hasta el momento, el único tratamiento aceptado para esta enfermedad consiste en una terapia de sangrados periódicos (flebotomía) tendiente a depletar las reservas internas de hierro. En una primera etapa (etapa de depleción) se extrae, una vez a la semana, una o dos unidades de sangre (500-1000 ml) conteniendo cada una 200-250 mg de hierro, hasta lograr niveles de ferritina sérica por debajo de 50 ng/ml y niveles de saturación de transferrina inferiores al 30 %. Esta primera etapa requiere habitualmente ser mantenida por un periodo de tiempo no inferior a 2 o 3 años. Posteriormente, en una segunda etapa (etapa de mantención) se realiza una flebotomía menos agresiva, pero de por vida para mantener los niveles de saturación de transferrina por debajo del 50 % (Niederau y col. 1985; Wojcik y col. 2002). Sin embargo, la velocidad de sobrecarga de hierro es altamente variable (Adams y col. 1991) y en muchos casos la saturación de transferrina permanece elevada y no se normaliza a menos que el individuo se convierta en deficiente de hierro. Estos fenómenos, sumados a la neutropenia y a la pérdida de proteínas plasmáticas que ocurren debido al proceso de extracción repetida de sangre afectan significativamente la calidad de vida del paciente (Trinder y col. 2002), lo que hace muy deseable el

desarrollo de una terapia alternativa mas corta y eficiente para combatir esta enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares Caco-2 (American Type Culture Culture Collection HTB-37, Rockville, MD) y HEK-293 (American Type Culture Culture Collection CRL-1573); las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GibcoBRL, Life Technologies, Bethesda, EE.UU.), suplementado con 1,5 g/L de  $\text{Na}_2(\text{CO}_3)_2$ , esterilizado mediante filtros de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, EE.UU.) y complementado con 100 U/mL de penicilina; 0,1 mg/mL de estreptomina (Gibco, Auckland, NZ) y 10 % de suero fetal de bovino (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.) en un incubador Napco 6101F-1 (Chicago, IL, EE.UU.) a 37°C, en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  (Indura, Santiago, Chile). Las células HEK-293 fueron cultivadas en placas de poliestireno de 35 mm (Sarstedt, Newton, NC, EE.UU.) mientras que las células Caco-2 fueron cultivadas en placas de poliestireno de 35 mm o en insertos bicamerales de 6,5 mm (Corning, NY, EE.UU.) dependiendo del tipo de experimento realizado.

### Construcciones plasmidiales y oligonucleótidos

**pAAV-AS1-DMT1:** Plasmidio que permite la expresión de un gen antisentido parcial contra el transportador de hierro DMT-1 humano; para construirlo se digirió el plasmidio comercial pAAV-MCS (Stratagene, Cedar Creek, TX, EE.UU.) con las enzimas de restricción *Hinc* II (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y *Xba* I (Invitrogen, Bethesda, MD, EE.UU.). Se ligó a este vector un fragmento de 295 pb correspondiente a la secuencia comprendida entre las posiciones 557 y 853 del cDNA de DMT-1 (GenBank AB004857) con la enzima T4 DNA ligasa (Promega). El fragmento de

DMT-1 ligado en pAAV-MCS fue obtenido por digestión del cDNA de DMT-1 con las enzimas de restricción *Eco* RI (Promega) (este extremo se hizo romo por relleno con fragmento Klenow) y *Xba* I.

**pAAV-AS2-DMT1:** Plasmidio que permite la expresión de un gen antisentido completo contra el transportador de hierro DMT-1 humano. Para construirlo se digirió el plasmidio comercial pAAV-MCS con las enzimas de restricción *Hind* III y *Sma* I (GibcoBRL, Bethesda, MD, EE.UU.). Se ligó a este vector un fragmento de 1700 pb correspondiente a la secuencia comprendida entre las posiciones 1 y 1700 del cDNA de DMT-1 con la enzima T4 DNA ligasa. El fragmento de DMT-1 ligado en pAAV-MCS fue obtenido por digestión del cDNA de DMT-1 con las enzimas de restricción *Hind* III y *Hinc* II. Tanto el gen antisentido parcial como el gen antisentido completo contra DMT-1 están generados con la secuencia codificante del cDNA por lo que están dirigidos tanto a la isoforma IRE como a la isoforma no IRE del mRNA de DMT-1.

**pAAV-AS1-Ferroportina:** Plasmidio que permite la expresión de un gen antisentido parcial contra el mRNA del transportador de hierro ferroportina humano. Para construirlo se digirió el plasmidio comercial pAAV-MCS con las enzimas de restricción *Eco*R I y *Hind* III; se ligó a este vector un fragmento de 249 pb correspondiente a la secuencia comprendida entre las posiciones 1857 y 2106 del cDNA de ferroportina (GenBank AF231121) con la enzima T4 DNA ligasa. El fragmento de ferroportina ligado en pAAV-MCS fue obtenido por digestión del cDNA con las enzimas de restricción *Eco*R I y *Hind* III.

**pAAV-AS2-Ferroportina:** Plasmidio que permite la expresión de un gen antisentido completo contra el mRNA del transportador de hierro ferroportina humano. Para construirlo se digirió el plasmidio comercial pAAV-MCS con la enzima de restricción

*EcoR I*; se ligó a este vector un fragmento de 1851 pb correspondiente a la secuencia comprendida entre las posiciones 253 y 2106 del cDNA de ferroportina con la enzima T4 DNA ligasa. El fragmento de ferroportina ligado en pAAV-MCS fue obtenido por digestión del cDNA con la enzima de restricción *EcoR I*.

**peGFP-M:** Plasmidio portador del gen de la proteína fluorescente verde mutado (eGFP-M) (G202C; Arg67Gly). La reversión de esta mutación puntual produce la completa recuperación de la fluorescencia de la proteína codificada. La mutación C202 fue generada por PCR usando como molde un plasmidio derivado del plasmidio comercial pAAV-MCS, portador de la región codificante de eGFP (730 pb) flanqueada por los sitios *EcoR I* y *Xba I* obtenida de peGFP-n1 (Clontech; GenBank U55761). Se realizaron dos reacciones de PCR mutagénicas independientes para amplificar la mitad 5' y la mitad 3' del gen *eGFP* utilizando los siguientes pares de partidores 5' CAA CGT GCT GGT CGT TGT GC 3' y 5' CTG CAC GCG GTA GGT CAG G 3' para la mitad 5' y 5' CCT GAC CTA CCG CGT GCA G 3' y 5' CTG GAG TGG CAA CTT CCA GG 3' para la mitad 3'. Posteriormente se combinaron ambos amplicones y se utilizaron como molde de PCR para generar la secuencia completa del gen *eGFP* mutado utilizando sólo los partidores externos. El producto obtenido (960 pb) fue digerido con *EcoR I* y *Xba I* y clonado en el plasmidio pCINeo (Stratagene, Cedar Creek, TX) río abajo del promotor del CMV.

**pCorrector:** Plasmidio que media la corrección génica. Secuencias de 166 pb (pCorrector166: nucleótidos 120 a 286 de *eGFP* silvestre), 365 pb (pCorrector365: nucleótidos 28 a 393 de *eGFP* silvestre) o 609 pb (pCorrector609: nucleótidos 1 a 609 de *eGFP* silvestre) fueron amplificadas por PCR y clonadas en un plasmidio al que se le eliminó el promotor y la señal de poliadenilación (pAAV-MCS digerido con *Not I*

(New England Biolab, Beverly, MA, EE.UU.) y tratado con Klenow). En todos los casos la secuencia correctora quedó flanqueada por las repeticiones terminales invertidas (ITRs) del AAV. La identidad de todas las construcciones fue confirmada por secuenciación.

**pAAV-Rep:** Plasmidio que contiene la secuencia mínima del gen *rep* del AAV bajo el control de su propio promotor. Este plasmidio proviene del plasmidio comercial pAAV-RC (Stratagene, Cedar Creek, TX, EE.UU.) en el que el gen que codifica para las proteínas de la cápside fue eliminado por digestión con *Pme* I y *Eco*N I (New England Biolab, Beverly, MA, EE.UU.), relleno con Klenow y posterior religación del cuerpo del vector.

**pAAV-Helper:** Plasmidio que contiene los genes adenovirales (AdV) ayudantes *E2A*, *E4* y *VA* (Stratagene, Cedar Creek, TX, EE.UU.) necesarios para el proceso de replicación del AAV.

**Oligonucleótido corrector sintético:** Oligonucleótido de 49 bases (posición 177 a 226 del gen *eGFP*) con la base correctora en la posición central. El oligonucleótido está protegido con tres grupos fosforotioatos en cada extremo y está dirigido hacia la cadena no codificante del gen. La síntesis y posterior purificación por HPLC fueron realizadas por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EE.UU.).

#### **Lipofección de células Caco-2 con los genes antisentido generados**

Se lipofectaron células Caco-2 crecidas en placas de 35 mm al 70 % de confluencia con 2 µg de los plasmidios portadores de los genes antisentido en DMEM sin suero y sin antibiótico durante 8 h con el uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Transcurrido el tiempo de lipofección se reemplazó el medio por

DMEM + 10 % SFB y se continuó el cultivo por 12 días antes de realizar las mediciones de incorporación de hierro y niveles de RNA antisentido.

### **Construcción de los vectores virales AAV**

Para generar los vectores virales AAV portadores de los genes antisentido contra DMT-1 y ferroportina se cultivaron células HEK-293 en placas de 10 cm hasta alcanzar 80 % de confluencia. Estas células fueron transfectadas utilizando la técnica de fosfato de calcio (Jordan y Wurm 2004) en DMEM sin suero con 10 µg de cada uno de los siguientes plasmidios: i) pAAV-AS-DMT1 o pAAV-AS-Ferroportina (plasmidios portadores de los genes antisentido contra DMT-1 o ferroportina respectivamente), ii) pAAV-RC (plasmidio portador de los genes *rep* y *cap* del AAV) y iii) pAAV-Helper (plasmidio portador de cuatro genes adenovirales necesarios para la replicación del AAV). Simultáneamente se generó un vector viral AAV portador del gen *lacZ* (virus control) por cotransfección de células HEK-293 con 10 µg de los plasmidios pAAV-Lacz, pAAV-RC y pAAV-Helper. Se reemplazó el medio de cultivo 24 h después de la transfección y se cosecharon las células tres días después de la transfección. Todos los plasmidios originales fueron obtenidos de Stratagene (Cedar Creek, TX, EE.UU.).

### **Purificación de vectores virales AAV**

Los vectores virales AAV fueron purificados por columnas de afinidad siguiendo el protocolo descrito por Auricchio y col (2001). Para ello se resuspendieron las células contenidas en una placa de 100 mm en 2,5 ml de DMEM. El lisado celular se obtuvo mediante dos ciclos de congelamiento y descongelamiento y posteriormente se incubó con 0,1 mg de DNasa I (Sigma, St. Luis, MO, EE.UU.) y 0,1 mg de RNasa A (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) durante 30 min a 37 °C. Posteriormente las

muestras fueron centrifugadas durante 15 min a 3000 x g a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, en donde se lo incubó con una solución de desoxicolato de sodio al 0,5 % (concentración final) por 30 min a 37 °C. La muestra obtenida fue filtrada secuencialmente a través de filtros con poros de 5 µm y 0,8 µm (Millipore, Carrigtwohill, CO, EE.UU.). El lisado crudo obtenido se aplicó a una columna de afinidad de heparina (Sigma, St. Luis, MO, EE.UU.) previamente equilibrada con 25 ml de tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4. Después de que todo el lisado paso a través de la columna esta fue lavada dos veces con 25 ml de PBS pH 7,4 conteniendo 0,1 M de NaCl. Se eluyeron los virus de la columna con 15 ml de PBS pH 7,4 conteniendo 0,4 M de NaCl. El eluido fue concentrado a 1 ml por centrifugación en un filtro Amicon Ultra 30 K MWCO (Millipore). Se rellenó el filtro con 25 ml de PBS y se centrifugo nuevamente para ajustar la concentración de NaCl a valores fisiológicos.

#### **Titulación de vectores virales AAV**

Se determinó el número de genomas virales por PCR semicuantitativa, comparando la intensidad de los amplicones generados por diferentes diluciones de la alícuota original de AAV con la intensidad de los amplicones obtenidos a partir de concentraciones conocidas del plasmidio utilizado para la producción de los vectores virales. Se obtuvieron títulos virales del orden de  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$ .

#### **Transducción de células Caco-2**

Se incubaron células Caco-2 sembradas en insertos bicamerales en un estado de preconfluencia con diferentes concentraciones (MOIs) de los AAV portadores de los genes antisentido o AAV-Lacz (virus control) en DMEM sin suero durante 8 h.

Cumplido este periodo se restituyeron los niveles normales de suero y las células se incubaron durante 12 días más para lograr un fenotipo diferenciado.

### **Preincubación de las células con hierro**

Las células Caco-2 fueron sembradas en placas de 35 mm o en insertos bicamerales de 6,5 mm y cultivadas durante 12 días postconfluencia para desarrollar un fenotipo polarizado; posteriormente las células fueron incubadas durante diferentes periodos de tiempo (24-72 h) con medio de cultivo completo conteniendo 50  $\mu\text{M}$  del complejo  $\text{FeCl}_3$ -nitrilo acetato de sodio no radiactivo (radio molar Fe-NTA 1:2). Se utilizó el ácido nitrilo acético (NTA) como agente complejante del hierro ya que este aumenta la biodisponibilidad del metal. Este complejo de hierro férrico es reducido a hierro ferroso por la reductasa luminal DcytB (McKie y col. 2001) y absorbido por las células en cultivo.

### **Determinación de la incorporación de hierro**

Las células diferenciadas y tratadas durante diferentes tiempos con 50  $\mu\text{M}$  de Fe-NTA o con las distintas dosis de los vectores virales AAV antisentido fueron lavadas con tampón salino (50 mM HEPES; 94 mM NaCl; 7,4 mM KCl; 0,74 mM  $\text{MgCl}_2$  y 1,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) e incubadas a 37°C por 1 h en tampón salino suplementado con 1  $\mu\text{M}$  del complejo  $^{55}\text{FeCl}_3$ -NTA (radio molar  $^{55}\text{Fe}$ -NTA 1:2). La absorción de hierro fue detenida lavando las células tres veces con PBS frío suplementado con 1 mM EDTA para eliminar el  $^{55}\text{Fe}$  unido extracelularmente. Las células fueron resuspendidas en tampón de lisis (40 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl y 1 mM EDTA; pH 7,5) y se midió la radioactividad asociada en un contador de centelleo líquido beta. La incorporación de

hierro se expresó como pmol de hierro por mg de proteína. La concentración total de proteína en cada muestra fue determinada por el método de Bradford (Tal y col. 1985).

#### **Determinación de la transferencia basolateral de hierro**

Después de incubar las células control o las tratadas con diferentes dosis del vector viral AAV-ferroportina antisentido en tampón salino suplementado con 5  $\mu$ M del complejo  $^{55}\text{FeCl}_3\text{-NTA}$  (radio molar  $^{55}\text{Fe-NTA}$  1:2) en el compartimiento apical durante 1 h, se recuperó el medio presente en el compartimiento basolateral (400  $\mu$ l) y se determinó la concentración de  $^{55}\text{Fe}$  por contador de centelleo líquido beta. La transferencia basolateral de hierro se expresó como porcentaje relativo de salida con respecto al hierro incorporado.

#### **Determinación de los niveles de mRNA de los transportadores de hierro**

Se extrajo RNA total a partir de las células control y de las células tratadas con las distintas condiciones experimentales mediante el uso de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El cDNA se obtuvo por transcripción inversa con el uso de la enzima M-MLV (Promega, Madison, WI, EE.UU.) a partir de 5  $\mu$ g de RNA total usando partidores específicos. Posteriormente 20% de la reacción de RT fue utilizada en la reacción de PCR con la enzima Taq polimerasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Se realizaron estudios para demostrar que los amplicones generados estaban en la región lineal de la reacción de PCR. Las reacciones de PCR para  $\beta$ -actina, DMT-1, ferroportina, receptor de transferrina I, 2'-5' A oligonucleótido sintetasa, IFITM-1 e ISGF3- $\gamma$  fueron realizadas a 94  $^{\circ}\text{C}$  por 30 s, a 60  $^{\circ}\text{C}$  por 60 s y 72  $^{\circ}\text{C}$  por 60 s por 24-30 ciclos. Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio, escaneados y cuantificados

mediante el uso del programa SCION Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation, EE.UU.). Los partidores utilizados en las amplificaciones fueron: 5' CTT CTA CAA TGA GCT GCG TG 3' y 5' GAG GAT CTT CAT GAG GTA GTC 3' para  $\beta$ -actina; 5' CTA GTA ACA GGA TAG CAA CAG 3' y 5' TTG GCT TGC TCG TAT TGA TTT 3' para ferroportina; 5' TGG CTC GGC AAG TAG ATG G 3' y 5' TCA CTG GAG ACT CGG TTC C 3' para el receptor de transferrina I; 5' AGG TGG TAA AGG GTG GCT CC 3' y 5' ACA ACC AGG TCA GCG TCA GAT 3' para la 2'-5' A oligonucleótido sintetasa; 5' AGC ATC CGG ACA CCA CAG C 3' y 5' ACG TCG CCA ACC ATC TTC C 3' para IFITM-1; 5' CAG AAC TGC ACA CTC AGT CC 3' y 5' CCT CTC AAG CTG GCT CAG C 3' para ISGF3- $\gamma$ ; 5' TTG ACT AAG GCA GAA TGC AGG 3' y 5' CGT TCT CAT CAC CAT TGC AG 3' para DMT-1; estos últimos partidores amplifican tanto la forma IRE como la forma no-IRE de DMT-1.

## **Transfecciones celulares**

### **A) Incorporación del gen *eGFP-M***

*i) Incorporación estable (integración):* Se lipofectaron células HEK-293 subconfluentes cultivadas en placas de 35 mm con 2  $\mu$ g del plasmidio peGFP-M (portador del gen *eGFP* mutado y de un gen de resistencia a neomicina) usando 4  $\mu$ l de lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbab, CA, EE.UU.). Las lipofecciones se realizaron durante 6 h en DMEM sin suero y en ausencia de antibióticos de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas fueron sometidas a varios ciclos de selección con 600 ng/ml de Geneticina (Gibco Life Technologies, Auckland, NZ). Después de 21 días de selección las células sobrevivientes fueron aisladas clonalmente y amplificadas. En

estos clones aislados, se analizó la expresión del gen *eGFP-M* por RT-PCR. Los clones positivos fueron utilizados en los experimentos subsiguientes.

*ii) Incorporación transiente (episomal):* Se lipofectaron células HEK-293 o Caco-2 con el plasmidio reportero *peGFP-M* como se describió anteriormente (alcanzando una eficiencia de transfección del 60 % y 20 % respectivamente).

## **B) Cotransfección con las moléculas correctoras**

Células HEK-293 portadoras del gen *eGFP-M* en forma episomal o integrado a su genoma fueron cotransfectadas con fosfato de calcio en DMEM sin suero durante 8 h con 2  $\mu$ g de (i) plasmidio *pCorrector* (*pCorrector166*, *pCorrector365* o *pCorrector609*) sólo o (ii) en combinación con 2  $\mu$ g de *pAAV-Rep* o *pAAV-Helper* o (iii) en combinación con 2  $\mu$ g de *pAAV-Rep* y 2  $\mu$ g de *pAAV-Helper*. La eficiencia de transfección lograda fue del 60 % independientemente de si las células fueron cotransfectadas con dos o tres plasmidios, por lo que el porcentaje de células que incorporan todos los plasmidios del sistema es aproximadamente 36 % cuando el plasmidio reportero se encuentra en forma episomal (dos transfecciones secuenciales) o 60 % en células que han integrado el gen reportero *eGFP-M* en su genoma (una sola transfección). El medio de cultivo fue reemplazado a las 8 h postransfección y las células fueron cosechadas 84 h después (92 h en total). Se consideró el porcentaje de transfección para calcular la eficiencia de corrección total.

## **Detención del ciclo celular**

Las células transfectadas con el sistema corrector completo fueron detenidas en diferentes etapas del ciclo celular 24 h después de realizada la transfección. Las células fueron detenidas en (i) la fase  $G_0$  del ciclo celular por privación del suero

durante 24 h (incubación en DMEM más 0,5 % de suero fetal de bovino); (ii) la fase S del ciclo celular por 24 h de incubación con 2 mM de timidina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) y (iii) la interfase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular por 24 h de incubación con 0,5 µg/ml de nocodazol (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). Después de cada uno de los tratamientos de detención se lavaron las células tres veces con PBS y se incubaron con medio completo por 44 h más. Cumplido este tiempo se evaluó el porcentaje de corrección génica obtenido.

#### **Determinación de la eficiencia de corrección**

La corrección génica lograda con el uso de los plasmidios correctores o del oligonucleótido corrector se determinó a las 92 h postransfección tanto contando células fluorescentes por microscopía, usando un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TS-100, como por citometría de flujo usando un citómetro FACSsort Becton Dickinson (excitación a 488 nm con un láser de argón, detección de la emisión a 525 nm). En este último caso los datos obtenidos fueron normalizados teniendo en cuenta la autofluorescencia normal de las células.

#### **Amplificación de las moléculas correctoras de cadena simple**

Para determinar si la secuencia de eGFP incorporada entre los ITRs virales en el plasmidio pCorrector609 es amplificada en presencia de los plasmidios pAAV-Rep y pAAV-Helper, se aisló DNA de las células HEK-293 transfectadas con las diferentes combinaciones plasmidiales usando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). El DNA presente en la fase acuosa fue sometido a una amplificación por PCR usando dos partidores que amplifican una secuencia de 166 pb presente entre los ITRs virales (partidores A y B) y dos partidores que amplifican una secuencia de 212 pb localizada

por fuera de la secuencia flanqueada por los ITRs virales (partidores C y D). Se realizaron estudios preliminares para demostrar que las bandas generadas y cuantificadas se encontraban en el rango lineal de la relación producto vs. molde. Las reacciones de PCR se realizaron por 24 ciclos de amplificación a 94°C por 30 sec, 60°C por 60 sec y 72°C por 60 sec. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 2 %, y posteriormente se escanearon y cuantificaron usando el programa SCION Alpha 4.0.3.2. La formación de DNA de cadena simple se determinó por la relación entre la intensidad del amplicón obtenido con los partidores A y B y la intensidad del amplicón obtenido con los partidores C y D.

#### **Determinación del mecanismo de corrección génica**

Para la determinación del mecanismo de corrección génica utilizamos una mutación silente (sustitución de una T por una A) incorporada en el gen *eGFP-M* y separada 167 bases río abajo de la mutación inactivante. Esta mutación silente produce la pérdida de un sitio de reconocimiento (GCATC) para la enzima de restricción *Sfa*N I, mientras que la mutación inactivante crea un sitio de reconocimiento (CGCG) para la enzima de restricción *Bst*U I. Se aisló el DNA total de las células HEK-293 transfectadas con los tres plasmidios del sistema corrector. Se realizó una reacción de PCR sobre este DNA para amplificar la secuencia completa del gen *eGFP-M* (el amplicón abarca tanto la secuencia de la mutación inactivante como la de la mutación silente) utilizando partidores que se anclan en el cuerpo del plasmidio *peGFP-M* (episomal o integrado), previniendo así la amplificación de la secuencia del plasmidio *pCorrector609* o de cualquier molécula de DNA de cadena simple generada a partir de él. El amplicón fue sometido a digestión con *Sfa*N I y se purificó y amplificó sólo las moléculas que fueron cortadas en el sitio de la mutación silente (moléculas

corregidas en esta posición). Posteriormente se determinó si el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Bst*U I continuaba presente en el producto amplificado, lo que indicaría que la mutación inactivante no fue corregida.

### **Análisis estadístico**

Todas las variables fueron testeadas en duplicados y los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. Se realizó T-test para analizar las diferencias entre las medias mediante el uso del programa SISA (Binomial.Sisa. <http://home.clara.net/sisa/binomial.htm>). Las diferencias fueron consideradas significativas a  $p < 0,05$ .

## OBJETIVOS

Comprender cuales son y como operan los mecanismos celulares encargados de regular la concentración corporal del hierro es de gran relevancia, tanto para poder estudiar los procesos de absorción, transporte y utilización de este importante metal como para poder identificar posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de la hemocromatosis hereditaria, una enfermedad muy prevalente entre la población caucásica, en la que la absorción intestinal de hierro se encuentra fuertemente aumentada en relación a la demanda corporal del mismo.

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivos generales:

- A) Estudiar los mecanismos celulares de regulación del transporte intestinal de hierro.
- B) Probar alternativas de reducción del transporte intestinal de hierro como posibles tratamientos para la hemocromatosis hereditaria.
- C) Desarrollar un sistema de modificación génica capaz de corregir (o introducir) mutaciones puntuales en células de mamíferos con posible utilidad en el tratamiento de un gran número de enfermedades genéticas entre las que se encuentra la hemocromatosis hereditaria.

Los objetivos generales propuestos fueron desarrollados en dos partes las cuales incluyen capítulos que intentan responder a ciertas preguntas que se detallan a continuación.

***Primera parte: Regulación de la absorción intestinal de hierro y posibles tratamientos para la hemocromatosis hereditaria.***

*¿Cómo células intestinales en cultivo regulan la tasa de absorción de hierro al ser incubadas con distintas concentraciones del metal?*

El objetivo de este capítulo consistió en estudiar la respuesta de células intestinales Caco-2 al ser incubadas con altas dosis de hierro durante distintos períodos de tiempo, diferenciando la respuesta obtenida en células cultivadas en insertos bicamerales (permiten una adecuada polarización celular) de la respuesta obtenida en células cultivadas en placas de poliestireno (se produce una polarización celular deficiente).

*¿Cuál es el efecto de la inhibición de la expresión del transportador de hierro DMT-1 en la incorporación apical de este metal y en la expresión de otros genes relacionados al metabolismo del hierro?*

En este capítulo nos propusimos desarrollar vectores virales AAV portadores de genes antisentido contra el mRNA del transportador de hierro DMT-1 tendientes a reducir su expresión en células intestinales Caco-2 y caracterizar el efecto de la reducción de la expresión de DMT-1 en la incorporación apical de hierro así como en la expresión de algunos genes implicados en el metabolismo celular de este metal.

*¿Cuál es el efecto de la inhibición de la expresión del transportador basolateral de hierro ferroportina en el transporte intestinal del metal?*

Este capítulo tuvo como objetivo estudiar el efecto de la inhibición de la expresión del transportador basolateral de hierro ferroportina en la incorporación apical y en el transporte basolateral del metal, utilizando vectores virales AAV portadores de genes antisentido contra el mRNA del transportador.

***Segunda parte: Desarrollo de un nuevo sistema de corrección génica con posible utilidad en el tratamiento de la hemocromatosis hereditaria.***

*¿Es posible generar un sistema de modificación génica capaz de corregir (o introducir) una mutación puntual con elevada eficiencia en células de mamíferos?*

En este capítulo nos propusimos desarrollar un sistema de corrección génica más eficiente y fácil de utilizar que los mecanismos de corrección actuales, evaluando su capacidad de corrección tanto para genes que se encuentran en forma episomal como para genes integrados de forma estable en el genoma celular.

## **PRIMERA PARTE**

**Mecanismos de regulación de la absorción intestinal de  
hierro y posibles tratamientos para la  
hemocromatosis hereditaria**

## **CAPÍTULO II**

### **MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE HIERRO EN CÉLULAS INTESTINALES**

#### **INTRODUCCIÓN**

Además de ser controlada por señales humorales como hepcidina, la absorción intestinal de hierro también es controlada por factores dietarios, incluyendo el propio hierro; así, la administración oral de elevadas dosis de hierro reduce fuertemente la posterior absorción del metal, a través de un fenómeno conocido como "bloqueo mucosal" (Oates y col. 2000; Yeh y col. 2000). Este es un proceso rápido (6 h post administración del hierro) caracterizado, en una primera etapa, por una redistribución del transportador DMT-1 desde la membrana apical del enterocito hacia compartimentos internos (Sharp y col. 2002) y posteriormente por una disminución de los niveles de mRNA de este transportador y de la reductasa férrica DcytB en los enterocitos absortivos (Frazer y col. 2003). Estas modificaciones también se observan al alimentar ratas durante varios días con una dieta rica en hierro; mientras que el paso de estos animales a una dieta deficiente de hierro produce una fuerte inducción en los niveles de mRNA y proteína de los transportadores DMT-1 y ferroportina (Gunshin y col. 1997; Canonne-Hergaux y col. 1999; Fleming y col. 1999), sugiriendo que los animales responden a distintas concentraciones de hierro regulando, en forma coordinada, el nivel de expresión de ambos transportadores en el intestino.

La línea celular humana Caco-2 ha sido muy utilizada como modelo para el estudio de los procesos de absorción y transporte de hierro; esta línea esta compuesta por células de adenocarcinoma de colon humano, que en cultivo se diferencian

espontáneamente desarrollando un fenotípico característico de intestino delgado (Fogh y col. 1977; Hidalgo y col. 1989). Las células Caco-2 son células polarizadas que expresan elevados niveles del transportador de glucosa Glut5, una proteína presente en la membrana apical del intestino delgado fetal y adulto, pero ausente en células de colon (Núñez y col. 1994). Estudios anteriores, en los que se utilizaron células Caco-2 como modelo de absorción intestinal, han demostrado una reducción cercana al 50 % en los niveles de mRNA del transportador DMT-1, cuando estas células son incubadas con altas concentraciones de hierro (20-100  $\mu$ M). En general estas modificaciones ocurren 48 a 72 h después de haberse expuesto al estímulo de hierro, sin observarse cambios significativos en los niveles de mRNA de DMT-1 a las 24 h de incubación con el metal (Tallkvist y col. 2000; Martini y col. 2002; Zoller y col. 2002; Johnson y col. 2005).

Al analizar los niveles proteicos del transportador DMT-1 se observó que las células tratadas con elevadas concentraciones de hierro producen una rápida disminución (6 h) de los niveles de este transportador en la membrana celular; sin embargo, la masa total de transportador se mantiene inalterada, indicando que se está produciendo una redistribución del transportador DMT-1 desde la membrana celular hacia compartimentos citoplasmáticos internos (Sharp y col. 2002; Johnson y col. 2005), efectos similares a los observados en el "bloqueo mucosal".

En el caso del transportador ferroportina los resultados han sido más contradictorios; mientras que algunos investigadores han reportado una reducción de hasta un 50 % en el nivel de mRNA de ferroportina al incubar células Caco-2 durante 48-72 h con concentraciones elevadas de hierro (Martini y col. 2002; Zoller y col. 2002) otros investigadores no han encontrado variaciones en el nivel de mRNA de este

transportador (Sharp y col. 2002; Johnson y col. 2005), indicando que posibles diferencias en las condiciones experimentales utilizadas como son el tiempo de incubación con hierro, las concentraciones de hierro utilizadas o el grado de diferenciación celular alcanzado pueden afectar los niveles de expresión de ferroportina de diferente manera.

Los objetivos del presente capítulo son i) caracterizar la respuesta de células Caco-2 al ser tratadas con distintas concentraciones de hierro, por diferentes periodos de tiempo; ii) diferenciar la respuesta obtenida en cultivos de células crecidas en insertos bicamerales, en donde se logra una correcta diferenciación celular, de la respuesta observada en células cultivadas en placas, en donde se generan epitelios irregulares con una pobre diferenciación celular; poniendo a prueba la siguiente hipótesis de trabajo:

*La expresión y niveles del transportador apical DMT-1 y la actividad del transportador basolateral ferroportina son alterados en forma inversa a los niveles de hierro presentes en el enterocito.*

## **RESULTADOS**

### **2.A) Curva de incorporación de hierro por células Caco-2**

Para caracterizar la curva normal de incorporación de hierro por células intestinales Caco-2 se incubaron durante 1 h células cultivadas en placas de poliestireno 10 días postconfluencia en tampón salino suplementado con distintas concentraciones de  $^{55}\text{Fe-NTA}$ . Las células fueron posteriormente lavadas en forma exhaustiva para eliminar el exceso de  $^{55}\text{Fe}$  asociado a las estructuras extracelulares y se cuantificó el hierro absorbido por contador de centelleo beta. **Figura 2.1** (página 46). En estos experimentos, utilizando concentraciones de  $^{55}\text{Fe-NTA}$  en el rango de 0,2 a 20  $\mu\text{M}$  no se detectó una saturabilidad de los sistemas de incorporación de hierro, observando una relación directa entre el hierro adicionado al medio de cultivo y la cantidad de metal absorbido por las células.

### **2.B) Regulación de la incorporación de hierro mediada por hierro en células cultivadas en placas o en insertos bicamerales.**

Se ha reportado que las células intestinales Caco-2 son capaces de sensor su concentración interna de hierro y regular la absorción en relación a las necesidades internas del metal, por lo que al ser incubadas con elevadas concentraciones de hierro debería observarse una disminución en la incorporación apical del metal y en los niveles de mRNA de los transportadores de hierro DMT-1 y ferroportina.

En estos experimentos evaluamos si células Caco-2 cultivadas en placas (polarización celular deficiente) poseen la misma capacidad de regulación de la absorción de hierro que células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales (permiten un acceso diferencial al compartimiento apical y basolateral logrando una polarización

celular eficiente, más parecida a un epitelio intestinal real). Para ello se cultivaron células Caco-2 en placas o en insertos bicamerales durante 15 días (12 días postconfluencia); posteriormente las células fueron precargadas, durante diferentes tiempos (24-72 h) con 50  $\mu\text{M}$  de Fe-NTA (a las células cultivadas en insertos bicamerales se les agregó el hierro sólo en el compartimiento apical). Cumplido el tiempo de precarga se agregó 1  $\mu\text{M}$  de  $^{55}\text{Fe}$ -NTA a las células cultivadas en placas y 5  $\mu\text{M}$  de  $^{55}\text{Fe}$ -NTA a las células cultivadas en insertos bicamerales. Se mantuvo el hierro en el cultivo durante 1 h y se midió la incorporación de hierro en un contador de centelleo beta; **Figura 2.2** (página 47).

Se observó que las células Caco-2 responden diferencialmente al hierro presente en el medio, dependiendo de las condiciones de cultivo. Sólo se logró una reducción significativa en la incorporación apical de hierro en células cultivadas en insertos bicamerales, no observándose este fenómeno en células cultivadas en placas.

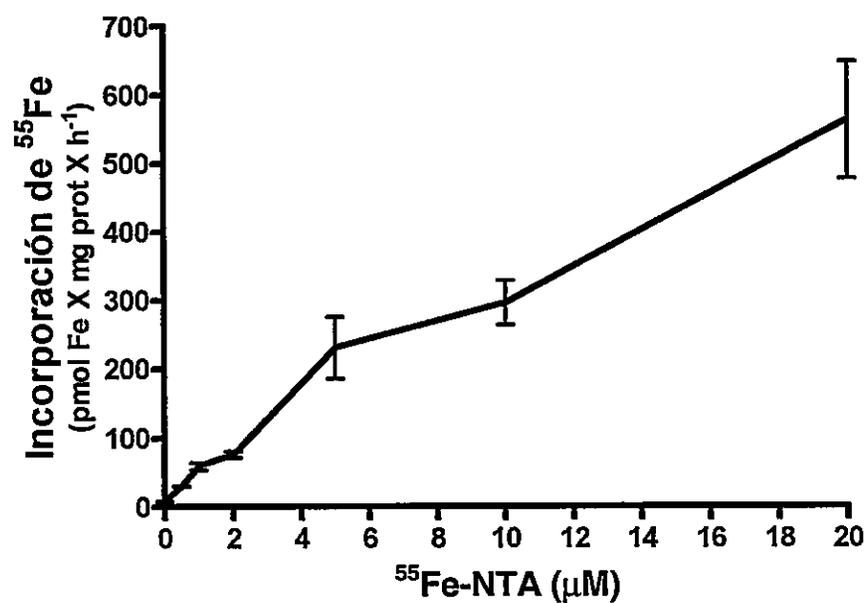
### **2.C) Expresión de los transportadores de hierro en células Caco-2 preincubadas con hierro por diferentes tiempos.**

Para evaluar la expresión de los transportadores de hierro se extrajo RNA total de células Caco-2 cultivadas en placas o en insertos bicamerales y preincubadas durante diferentes tiempos con 50  $\mu\text{M}$  de Fe-NTA. Se analizó el nivel de expresión de los genes *DMT-1* y *ferroportina* por RT-PCR semicuantitativa; **Figura 2.3** (página 48).

En células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales se observó una reducción de los niveles de mRNA tanto del transportador DMT-1 como del transportador ferroportina cuando estas fueron preincubadas durante 72 h con hierro, sin encontrarse diferencias significativas en los niveles de mRNA de ambos

transportadores con tiempos de precarga más cortos. Para el caso de las células cultivadas en placas, contrariamente a lo esperado, no se observaron variaciones significativas en los niveles mRNA de ambos transportadores.

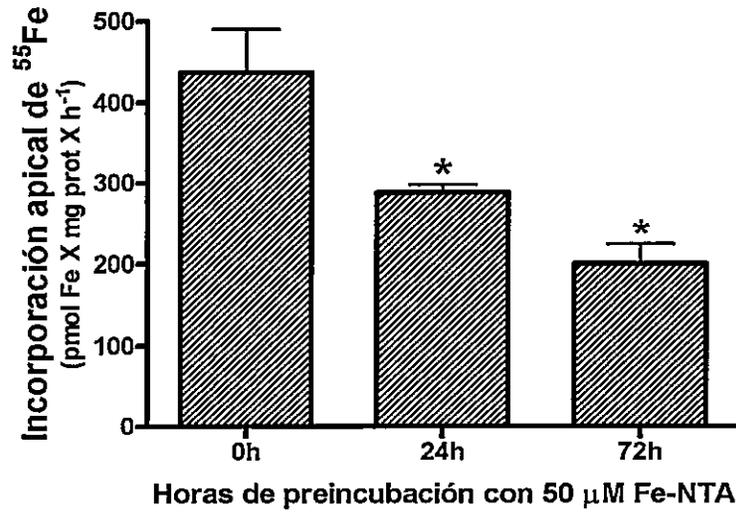
## FIGURAS



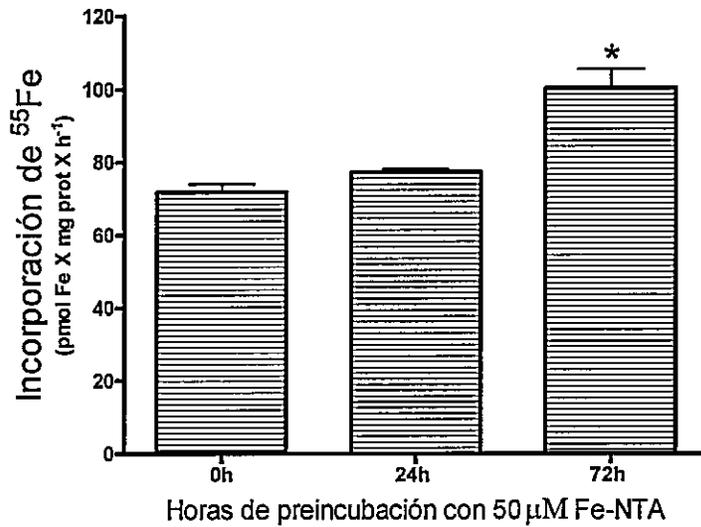
**Figura 2.1** Curva de incorporación de hierro por células Caco-2 en cultivo: Células Caco-2 crecidas en placas durante 10 días postconfluencia fueron incubadas durante 1 h con diferentes concentraciones de  $^{55}\text{Fe}$ -NTA. Se determinó la incorporación de hierro por las células utilizando un contador de centelleo beta.  $n = 3$ .

---

(A) Células cultivadas en insertos bicamerales



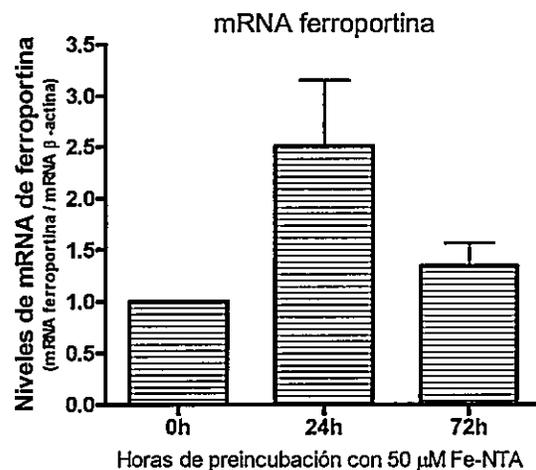
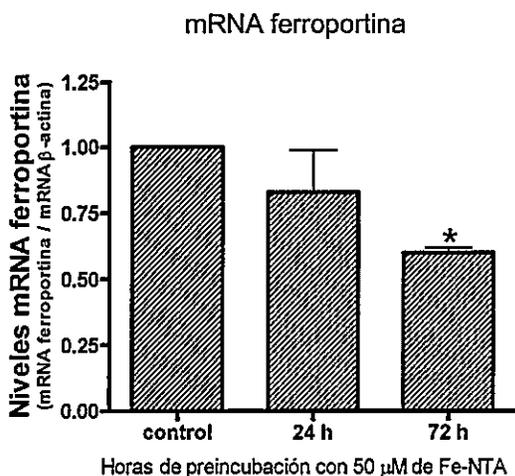
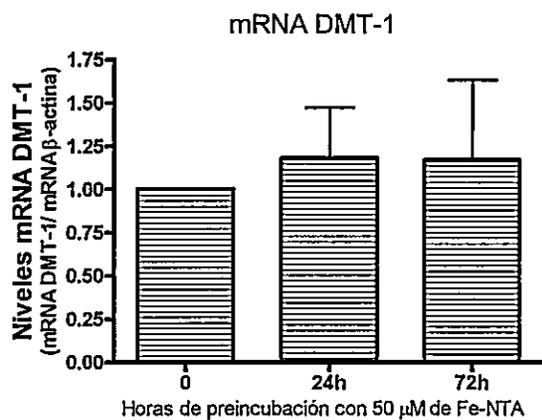
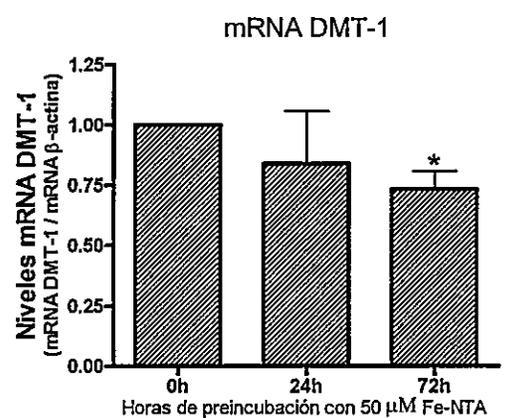
(B) Células cultivadas en placas



**Figura 2.2 Incorporación de  $^{55}\text{Fe}$  en células Caco-2 preincubadas con altas concentraciones de hierro:** Células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales (figura A) o en placas de poliestireno (figura B) fueron precargadas por diferentes tiempos con 50  $\mu\text{M}$  de Fe-NTA. Posteriormente se agregó 5  $\mu\text{M}$  de  $^{55}\text{Fe}$ -NTA a las células cultivadas en insertos bicamerales y 1  $\mu\text{M}$  de  $^{55}\text{Fe}$ -NTA a las células cultivadas en placas de poliestireno y se midió incorporación de hierro con contador de centelleo beta;  $n = 6$ ;  $p < 0,05$  t-test vs. control 0 h.

Células cultivadas en insertos bicamerales

Células cultivadas en placas



**Figura 2.3 Niveles de mRNA de los transportadores de hierro DMT-1 y ferroportina en células Caco-2 preincubadas con altas concentraciones de hierro:** Reacciones de RT-PCR para los transportadores de hierro DMT-1 y ferroportina a partir de RNA extraído de células cultivadas durante 12 días postconfluencia en insertos bicamerales (panel izquierdo) o en placas de poliestireno (panel derecho) precargadas durante diferentes tiempos con 50  $\mu$ M de Fe-NTA;  $n = 3$ ;  $p < 0,05$  t-test vs. control 0 h.

## DISCUSIÓN

La línea celular Caco-2 ha sido ampliamente utilizada como modelo intestinal para el estudio de la absorción y transporte de metales. En el presente trabajo se observó un incremento en la absorción de hierro a medida que se aumenta la concentración del metal en el medio de cultivo, para todo el rango de concentraciones analizadas. Este hallazgo indica que el sistema no es saturable por concentraciones de hierro cercanas a las normalmente presentes en el lumen intestinal. Debido a que las células presentaron una absorción del metal lo suficientemente alta como para ser detectada en un contador de centelleo beta, en los experimentos subsiguientes, se decidió trabajar con bajas concentraciones de  $^{55}\text{Fe-NTA}$  (1-5  $\mu\text{M}$ ), para así evitar o al menos reducir la absorción inespecífica de  $^{55}\text{Fe}$  mediada por algún otro mecanismo distinto a DMT-1 que actúe con menor afinidad por el metal.

En la literatura se han reportado resultados contradictorios sobre las modificaciones que sufren los niveles de expresión de los transportadores de hierro DMT-1 y ferroportina al incubar células intestinales Caco-2 con distintas concentraciones de hierro, sugiriendo que la absorción del metal en estas células, además de estar regulada por acción del sistema IRP/IRE también depende de otros factores como el grado de diferenciación celular alcanzado o la presencia de algún otro tipo de señal celular como es la activación de IRP1 por estrés oxidativo mediado por hierro (Núñez y col. 2003).

En los experimentos presentados en este capítulo se evaluaron las modificaciones en la incorporación de hierro por parte de células preincubadas durante distintos tiempos con altas concentraciones del metal, pero diferenciando el efecto

obtenido en células cultivadas en insertos bicamerales (permiten una completa polarización celular, generando un modelo parecido al epitelio intestinal) del efecto obtenido en células cultivadas en placas (se produce una polarización celular ineficiente). En células cultivadas en insertos bicamerales se observó una importante reducción en la incorporación de hierro después de 24 h de precarga con el metal, alcanzando una reducción máxima cercana al 50 % después de 72 h de precarga. Estos resultados indican que las células Caco-2 responden rápidamente al hierro presente en el medio de cultivo evitando una sobrecarga tóxica del metal. Por el contrario, las células cultivadas en placas mostraron un pequeño aumento en la incorporación de hierro en lugar de la reducción esperada, lo que sugiere que el grado de diferenciación alcanzado por las células cultivadas en placas no es suficiente para lograr un sistema de regulación de la absorción de hierro completamente funcional. Sin embargo, una posibilidad alternativa es que la disposición de las células en la placa genere un espacio muy limitado para la salida del hierro, llevando a una reducción en la salida basolateral del metal con la consiguiente acumulación del mismo en el interior celular. Se ha reportado, en diferentes tipos celulares, que la presencia de altas concentraciones de hierro en el interior celular es capaz de generar un estrés oxidativo que activa a la proteína reguladora de hierro IRP1 generando un mecanismo de retroalimentación positiva que lleva a un aumento en la absorción de hierro y a la muerte de la célula por apoptosis (Núñez y col. 2003). Este mecanismo de retroalimentación positiva podría explicar el aumento en la incorporación apical de hierro observado en células Caco-2 cultivadas en placas de poliestireno.

Esta es la primera vez que se reporta una respuesta diferencial de las células Caco-2 al hierro dependiendo de si estas son cultivadas en placas o en insertos

bicamerales y creemos que es de gran importancia debido a que en la literatura generalmente se utiliza el modelo de célula crecida en placa o en insertos bicamerales como si fueran modelos equivalentes (Tallkvist y col. 2000; Tallkvist y col. 2003).

Al analizar los niveles de mRNA de los transportadores de hierro en células cultivadas en insertos bicamerales se observó una reducción significativa tanto en el mRNA de DMT-1 como en el mRNA de ferroportina, pero sólo después de 72 h de precarga con altas concentraciones de hierro; fenómeno consistente con la respuesta observada tanto en ratas como en tejidos duodenales humanos (Gunshin y col. 1997; Zoller y col. 1999). Estos datos indican que, en células Caco-2, los niveles de mRNA de DMT-1 y ferroportina serían regulados de forma coordinada dependiendo de la concentración intracelular de hierro; sin embargo, el tiempo de la respuesta observada para los mRNA (72 h) está claramente desfasado con respecto a la reducción de la incorporación de hierro observada a las 24 h de precarga con el metal. Estos datos sugieren que en las células Caco-2 también ocurre el fenómeno del "bloqueo mucosal" (Oates y col. 2000; Yeh y col. 2000) en donde la primera respuesta (antes de las 24 h) consiste en una internalización del transportador DMT-1 desde la membrana plasmática a compartimentos citoplasmáticos internos, generando una rápida reducción de la incorporación apical de hierro y posteriormente, en una segunda etapa, las células regularían el nivel de expresión de los transportadores de hierro DMT-1 y ferroportina.

Las células cultivadas en placa no redujeron los niveles de mRNA de ninguno de los transportadores de hierro analizados.

La reducción de los niveles de mRNA de DMT-1 aquí observada es coincidente con el mecanismo de acción propuesto para el sistema IRP/IRE, en donde la

estabilidad del mRNA sería afectada por la disociación dependiente de hierro de las proteínas IRP del elemento IRE presente en el extremo 3' no traducido de la isoforma de DMT-1 más abundante tanto en el epitelio intestinal como en células Caco-2 (Lee y col. 1998; Tandy y col. 2000; Hubert y Hentze 2002). Es posible que el retardo de 72 h aquí observado se deba a que a diferencia del mRNA del receptor de transferrina I, que posee cinco elementos IRE en su extremo 3' no traducido y que es capaz de responder rápidamente a las variaciones intracelulares de hierro, el mRNA de DMT-1 sólo posee un elemento IRE regulando su estabilidad, convirtiéndolo en un mRNA menos sensible a los cambios en las concentraciones intracelulares de hierro (Casey y col. 1989).

A diferencia del mRNA de DMT-1, el mRNA de ferroportina posee un elemento respuesta IRE en su extremo 5' no traducido (McKie y col. 2000) que debería conferirle una regulación contraria a la aquí observada. Algunos trabajos han postulado que debido a la distancia inadecuada que separa a este elemento regulatorio IRE del sitio de inicio de la transcripción, este no sería funcional (Eisenstein y Ross 2003). Experimentos de Run-on, donde se evaluó tanto la expresión del gen *ferroportina* como la del gen *DMT-1* han demostrado una reducción en sus niveles de transcripción al incubar células intestinales con altas concentraciones de hierro (Zoller y col. 2002) sugiriendo un mecanismo de regulación transcripcional distinto del sistema IRP/IRE (regulación postranscripcional). Nosotros creemos que este tipo de regulación podría explicar las variaciones en los niveles de mRNA de ferroportina observadas en estos experimentos, sin embargo la naturaleza de las señales que desencadenaría esta regulación es aún desconocida.

Al interpretar estos datos es necesario tener presente que las células Caco-2 derivan de un adenocarcinoma y por lo tanto no son idénticas a los enterocitos duodenales normales, por lo que no es posible realizar una extrapolación directa de los resultados aquí obtenidos al intestino humano.

## **CAPÍTULO III**

### **INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DMT-1 POR AAV ANTISENTIDO**

#### **INTRODUCCIÓN**

Las alteraciones en la homeostasis corporal del hierro conducen a frecuentes patologías entre las que se encuentra la hemocromatosis hereditaria (HH), una enfermedad de alta prevalencia en caucásicos caracterizada por un aumento en la absorción intestinal de hierro a pesar de que las reservas corporales del metal se encuentran elevadas (Brittenham y col. 2000). Estudios han demostrado que tanto pacientes que padecen de HH como ratones knockout para HFE (modelo animal de la enfermedad) expresan niveles anormalmente elevados del transportador apical de hierro DMT-1 en el epitelio intestinal (Fleming y col. 1999; Levy y col. 2000; Stuart y col. 2003). Esta es una proteína transmembrana fuertemente expresada en la membrana apical del enterocito absortivo, en donde participa en la incorporación del hierro iónico presente en la dieta (Canonne-Hergaux y col. 1999), pero también se encuentra en las membranas endosomales de todas las células del organismo (en especial en células precursoras hematopoiéticas) en donde se encarga de la transferencia desde el endosoma al citoplasma del hierro incorporado a través del ciclo Tf-TfR I (Garrick y col. 1993; Fleming y col. 1998; Gruenheid y col. 1999).

Aproximadamente el 80 % de los pacientes con síntomas clínicos de HH son homocigotos para una mutación puntual en el gen que codifica la proteína HFE (Beutler y col. 1996; Bomford 2002). Si bien aún se desconoce la función exacta de esta proteína en el epitelio intestinal, se ha postulado que ella actúa como un inhibidor de la incorporación de hierro por el enterocito (Fleming y col. 1999; Levy y col. 2000;

Zoller y col. 2001). Trabajos recientes han demostrado que la sobreexpresión de la proteína HFE en células intestinales Caco-2 produce una marcada reducción en la incorporación apical de hierro (Arredondo y col. 2001). Sin embargo, esta reducción no sería consecuencia de una disminución en los niveles del transportador DMT-1 presente en la membrana apical (de hecho los niveles de DMT-1 en las células que sobreexpresan HFE son mayores que en las células normales) sino a una inhibición de la actividad de este transportador, mediada en forma directa o indirecta por acción de la proteína HFE. Esta regulación en la absorción de hierro se perdería en pacientes con HH ya que las mutaciones en HFE la convierten en una proteína no funcional.

Se han descrito al menos cuatro modelos animales en donde mutaciones en el gen que codifica para DMT-1 produce una expresión deficiente de este transportador; de ellos los más estudiados corresponden a los modelos de ratones microcíticos *mk* y de ratas Belgrade b (Fleming y col. 1997; Fleming y col. 1998). En ambos casos, los animales poseen la mutación Gly185Arg en el transportador DMT-1, que afecta tanto el plegamiento como la glicosidación de la proteína, convirtiéndola en una proteína no funcional. Estos animales desarrollan una anemia hipocrómica severa con una marcada disminución en la sobrevivencia de los eritrocitos.

En humanos, recientemente se identificó por primera vez una mutación en el gen que codifica para DMT-1; esta mutación involucra la sustitución Glu399Asp, y de forma similar a las mutaciones descritas en los modelos animales, los pacientes que presentan estas mutaciones desarrollan un fenotipo de deficiencia de hierro en las células eritrocíticas, aunque en este caso también se presentan algunos síntomas de sobrecarga de hierro como es el aumento en la concentración hepática del metal (Priwitzerova y col. 2005).

La mutación Glu399Asp en DMT-1 afecta un sitio donador de procesamiento del mRNA, provocando un aumento en los niveles de una forma no funcional de DMT-1 en el tejido hematopoiético. Se ha postulado que en esta enfermedad los sistemas de regulación de la absorción intestinal de hierro detectarían el fenotipo de deficiencia del metal en el tejido eritroide y aumentarían la expresión intestinal de DMT-1 para cubrir la deficiencia de hierro observada, llevando a la aparición de algunos signos de sobrecarga de hierro en otros tejidos.

La marcada deficiencia de hierro observada en los modelos animales que carecen de DMT-1 sugiere claramente que este es el principal transportador involucrado en la absorción intestinal de hierro; sin embargo, el hecho de que las mutaciones en DMT-1 no sean letales apoya la idea de la posible participación de otros transportadores de hierro que actúen a nivel de la absorción intestinal del metal, compensando al menos en parte el defecto observado en estos animales. Varios trabajos han sugerido que mobilferrina, una proteína muy similar a la chaperona calreticulina participaría en la incorporación de hierro al enterocito en la forma de  $Fe^{+3}$ . Este sistema ha sido observado tanto en tejido duodenal de rata como en tejido duodenal humano (Conrad y col. 1992; Conrad y col. 1993; Conrad y Umbreit 1993) y se propone que sería parte de una vía de entrada de hierro distinta a DMT-1 debido a que la incubación de las células con un anticuerpo bloqueante contra DMT-1 reduce la entrada de  $Fe^{+2}$  pero no la de  $Fe^{+3}$ , mientras que el uso de un anticuerpo bloqueante contra mobilferrina reduce la entrada de  $Fe^{+3}$  sin alterar la entrada de  $Fe^{+2}$  (Conrad y col. 2000). Sin embargo, la posible contribución de esta vía a la incorporación total de hierro por el enterocito absorbivo no ha podido ser dilucidada ya que los animales

knockout para mobilferrina no son viables, sugiriendo un rol importante de esta proteína en otras funciones biológicas (Coppolino y col. 1997; Mesaeli y col. 1999).

El estudio del rol de DMT-1 en el transporte de metales se ha basado principalmente en experimentos de sobreexpresión del transportador por transfección (Worthington y col. 2000) y en experimentos de control de la expresión de DMT-1 por hierro (Tandy y col. 2000). Aunque estas aproximaciones son estrategias útiles, la sobreexpresión de DMT-1 conduce a la producción de elevados niveles de la proteína que podrían no reflejar eventos fisiológicos. Para evitar este problema en el presente capítulo estudiamos el rol de DMT-1 en la homeostasis de hierro a través de la inhibición de su expresión por técnicas de antisentido.

Una de las formas de inhibir la expresión de un gen por técnicas de antisentido consiste en la administración de oligonucleótidos antisentidos sintetizados químicamente. Una vez dentro de las células, estas moléculas son capaces de reconocer su secuencia blanco y unirse a ella impidiendo su traducción por bloqueo de la unión del ribosoma (Bennett 2002; Sazani y col. 2002); sin embargo, estas pequeñas moléculas son rápidamente hidrolizadas por las nucleasas celulares, reduciendo significativamente el efecto inhibitorio alcanzado. En este trabajo generamos genes capaces de producir, en grandes cantidades, las moléculas de antisentido en el interior de la célula blanco reduciendo así el efecto de degradación por nucleasas.

Existen dos sistemas principales para la administración de genes exógenos, como es el gen productor de moléculas de antisentido, a células de mamíferos basados en el uso de vectores virales o vectores no virales como vehículo de entrega. En general, los vectores virales presentan una serie de ventajas sobre los métodos no

virales debido a la mayor eficiencia de entrega y a la mayor direccionalidad que se le puede dar al transgén (Anderson 1992). Dentro del grupo de los vectores virales nosotros elegimos los vectores adenoasociados (AAV) ya que ellos cuentan con las siguientes ventajas: i) permiten la infección a un rango de huésped muy amplio que incluye células intestinales en cultivo; ii) infectan tanto a células en división como a células diferenciadas; iii) pueden usarse para establecer una expresión del transgén a largo plazo y iv) no se han asociado a ningún tipo de patología en humanos (Grimm y Kleinschmidt 1999; Carter y Samulski 2000; Monahan y Samulski 2000).

Estudios en los que se generaron ratones doble knockout por cruce de ratones HFE<sup>-/-</sup> (modelo de HH con alta absorción intestinal de hierro) con ratones microcíticos *mk* (deficientes en DMT-1) demostraron, que en los animales generados, las mutaciones en HFE no producen un aumento en la absorción de hierro (Levy y col. 2000), sugiriendo que la sola reducción de la expresión del transportador DMT-1 en pacientes que padecen de HH sería un tratamiento muy efectivo en inhibir la exacerbada absorción del metal característica de la enfermedad.

Los objetivos del presente capítulo son i) desarrollar vectores virales AAV portadores de genes antisentido contra en mRNA del transportador DMT-1 y ii) evaluar los efectos de la transducción de estas construcciones en células intestinales epiteliales Caco-2; poniendo a prueba la siguiente hipótesis de trabajo:

*La inhibición específica de la expresión de DMT-1 en células Caco-2 reduce la entrada de hierro e inhibe el transporte transepitelial del metal a pesar de la posible inducción de los niveles de mRNA de ferroportina y del receptor de transferrina I.*

## **RESULTADOS**

### **3.A) Producción de genes antisentido contra el transportador de hierro DMT-1**

Con el uso de técnicas de biología molecular se generaron dos genes antisentido contra el mRNA del transportador de hierro DMT-1 humano. Uno de los genes antisentido corresponde a una secuencia parcial interna de 295 pb del cDNA de DMT-1 (pAAV-AS1-DMT1) mientras que el otro gen antisentido corresponde a la secuencia completa (1700 pb) del cDNA de DMT-1 (pAAV-AS2-DMT1). Ambas secuencias se encuentran en orientación invertida con respecto al promotor del CMV en el plasmidio pAAV-MCS, que permite la posterior producción de partículas virales AAV. El gen antisentido completo, al presentar una mayor homología con respecto al mRNA blanco, debería ser más efectivo que el gen antisentido parcial en producir el bloqueo de la traducción. Sin embargo, se ha reportado que en algunos tipos celulares la presencia de RNA de doble cadena mayores a 300 pb es capaz de generar efectos tóxicos (Bridge y col. 2003), por lo que el uso del gen antisentido parcial contra DMT-1 podría resultar menos nocivo que el gen antisentido completo.

### **3.B) Plasmidios: evaluación de la funcionalidad de los genes antisentido**

Para evaluar la funcionalidad de los genes antisentido producidos, se lipofectaron células Caco-2 con los plasmidios portadores de las distintas construcciones antisentido y se midió: i) la expresión de los genes antisentido por RT-PCR y ii) el posible efecto inhibitorio de la expresión de estos genes en la incorporación de hierro; **Figura 3.1** (página 65).

En estos experimentos se observó que las células lipofectadas expresan tanto el gen antisentido completo como el gen antisentido parcial contra DMT-1. Sin

embargo, esta expresión sólo se correlacionó con una reducción marginal del 20 % en la incorporación de hierro, alcanzándose eficiencias de lipofección máximas cercanas al 25 %. Las células Caco-2 son células muy difíciles de transfectar por técnicas convencionales, lo que justifica la producción de vectores virales AAV ya que estos permiten lograr una mejor entrega de los genes antisentido construidos a las células intestinales.

### **3.C) Vectores AAV: producción de vectores virales portadores de genes antisentido**

Para la producción de vectores virales AAV se cotransfectaron células HEK-293 con los plasmidios pAAV-AS1-DMT1 o pAAV-AS2-DMT1 junto con los plasmidios pAAV-RC (aporta el gen de la polimerasa viral Rep y los genes de la cápside del virus Cap) y pAAV-Helper (aporta genes adenovirales necesarios para el ensamblaje del AAV). Las células cotransfectadas fueron cultivadas durante 48 h para permitir el ensamblaje de las partículas virales y posteriormente fueron lisadas para producir la liberación de las mismas. Las partículas virales generadas fueron purificadas a través de una columna de afinidad y cuantificadas mediante reacciones de PCR semicuantitativas, obteniéndose títulos virales del orden de  $1 \times 10^9$ ; **Figura 3.2** (página 66).

Siguiendo la misma metodología experimental se construyeron vectores virales AAV que portan el gen *Lacz* para ser utilizados como vector control de infección viral.

### **3.D) Vectores AAV: inhibición de la incorporación de hierro mediada por vectores virales**

Para evaluar el posible efecto inhibitorio de los AAV antisentidos en la incorporación apical de hierro, células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales fueron incubadas durante 8 h con distintas concentraciones (MOIs) de partículas virales AAV conteniendo el gen antisentido contra el mRNA de DMT-1 o con partículas virales AAV portadores del gen *Lacz* (virus control). Después de la transducción con los vectores AAV las células fueron cultivadas por 12 días más hasta obtener una completa diferenciación celular y se evaluó en ellas la capacidad de incorporación apical de <sup>55</sup>Fe; **Figura 3.3** (página 67). En estos experimentos se utilizó solamente el vector viral AAV que porta el gen antisentido parcial contra DMT-1 debido a que en ensayos preliminares se observó que este vector era más eficiente en reducir la incorporación apical de hierro que el vector que porta el gen antisentido completo contra el mRNA del transportador.

Las células transducidas con distintas concentraciones del vector viral AAV antisentido mostraron una marcada reducción (55 %) en la incorporación apical de hierro, aún con la dosis viral más baja utilizada. El aumento de la dosis viral no produjo una mayor reducción en la incorporación apical del metal. En estos experimentos, el porcentaje de transducción obtenido con el vector AAV-*Lacz* (vector control) al utilizar una dosis viral de 70 MOI fue superior al 50 %.

### **3.E) Posibles mecanismos de acción de los genes de antisentido generados**

Para evaluar el posible mecanismo por el cual los genes de antisentido inhiben la incorporación apical de hierro se extrajo RNA total de las células transducidas con el

vector AAV-DMT1 antisentido o con el vector AAV-Lacz y se determinaron los niveles de expresión tanto del gen *DMT-1* antisentido como del gen *DMT-1* endógeno; **Figura 3.4** (página 68).

En estos experimentos se observó que el aumento de la dosis viral utilizada en la transducción de las células Caco-2 produjo un claro aumento en el nivel de expresión del gen *DMT-1* antisentido. Al utilizar bajos niveles de infección (MOI = 5) la expresión del gen antisentido produjo una marcada reducción en el nivel de mRNA de *DMT-1* endógeno, sugiriendo un mecanismo de degradación del mRNA tipo RNAi. Sin embargo, al aumentar la dosis viral (MOIs 10-70) el nivel de mRNA de *DMT-1* endógeno se mantuvo cercano al nivel hallado en las células control, sugiriendo un efecto de inhibición de la expresión de *DMT-1* por ocupación del mRNA blanco y bloqueo de la traducción, ya que se observan niveles normales de mRNA de *DMT-1* pero la actividad del transportador continúa disminuida.

### **3.F) Expresión de los transportadores ferroportina y receptor de transferrina I en células con bajo nivel de incorporación de hierro**

En células intestinales, la expresión del receptor de transferrina I es regulada por acción del sistema IRP/IRE en forma inversa a la concentración intracelular de hierro (Casey y col. 1989); sin embargo, aún no está claro si el mismo sistema actúa también regulando la expresión de ferroportina o si este transportador sólo responde a señales provenientes del hígado.

En el presente experimento se evaluó el nivel de expresión de ambos genes en células que presentan una reducción en la incorporación apical de hierro (por inhibición de la expresión de *DMT-1*). Para ello se extrajo RNA total de células transducidas con

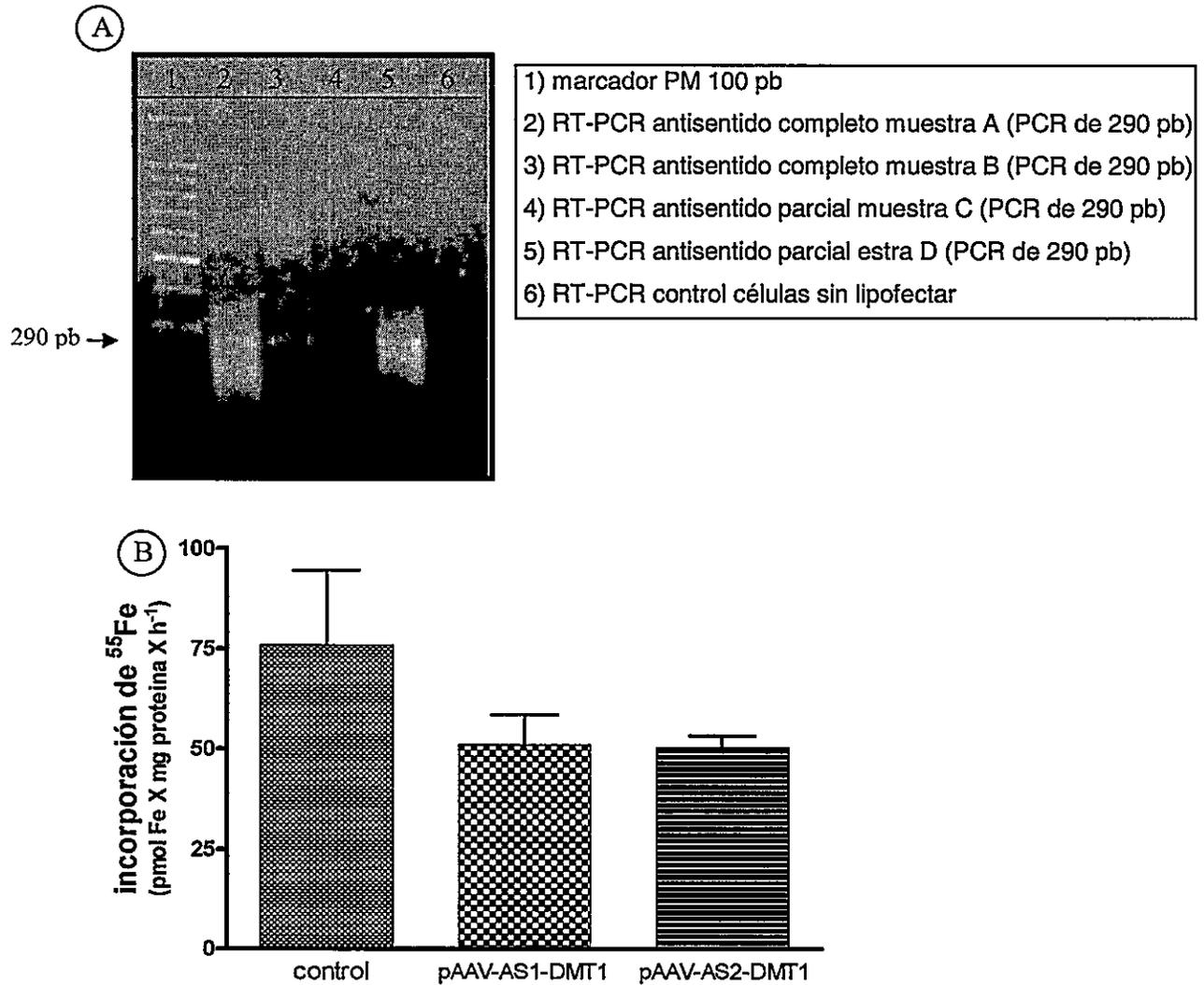
distintas dosis de AAV-DMT1 antisentido o AAV-Lacz y se realizaron reacciones de RT-PCR con partidores específicos para ferroportina y para TfR I; **Figura 3.5** (página 69). Contrariamente a lo esperado, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de mRNA de ambos transportadores presentes en células con baja incorporación apical de hierro con respecto a los niveles hallados en células control. Es importante destacar que las muestras fueron analizadas mediante reacciones de RT-PCR semicuantitativa. Estos datos podrían ser corroborados con el uso de técnicas más sensibles como es la PCR de tiempo real, para así poder descartar pequeñas variaciones en los niveles de mRNA que no es posible detectar mediante la técnica de PCR semicuantitativa empleada en estos experimentos.

### **3.G) Evaluación de la posible activación de mecanismos celulares de respuesta antiviral.**

La presencia de RNA de doble cadena largos (mayores a 300 pb) en el interior celular (como los formados por el dúplex RNA sentido/RNA antisentido) es capaz de activar mecanismos celulares de defensa antiviral (sistema del interferón) que conducen a un bloqueo masivo de la síntesis de proteínas y a la degradación inespecífica del RNA, fenómenos que pueden llevar a la célula a una muerte por apoptosis (Bridge y col. 2003; Sledz y col. 2003). En este trabajo determinamos si el RNA antisentido generado en el interior de las células Caco-2 es capaz de activar estos mecanismos de defensa antiviral. Para ellos evaluamos por RT-PCR la expresión de tres genes que aumentan significativamente su expresión al activarse los mecanismos de defensa antiviral del interferón. Estos son: i) 2'-5'A oligonucleótido sintetasa, ii) IFITM-1 e iii) ISGF-3 $\gamma$ ; **Figura 3.6** (página 70).

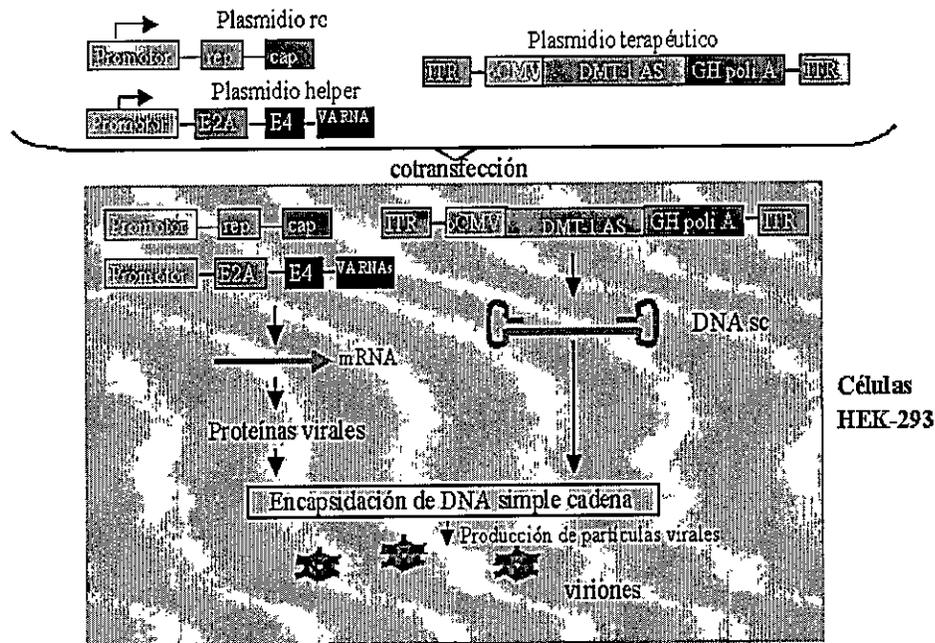
Las células transducidas con los vectores virales AAV-DMT1 antisentido no presentaron diferencias significativas en la expresión de los tres genes marcadores de activación de la vía del interferón analizados con respecto a las células control.

## FIGURAS

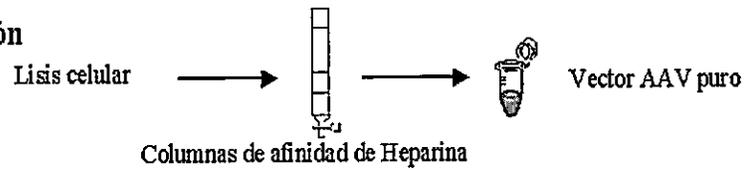


**Figura 3.1 Evaluación de la funcionalidad de los genes de antisentido (plasmidio):** A) RT-PCR a partir de RNA total extraído de células Caco-2 control (sin lipofectar) o células Caco-2 lipofectadas con los plasmidios pAAV-AS1-DMT1 (gen antisentido parcial contra DMT-1) y pAAV-AS2-DMT1 (gen antisentido completo contra DMT-1). Los partidores utilizados amplifican un fragmento de 290 bases presente tanto en el antisentido parcial como en el antisentido completo. B) Incorporación de  $^{55}\text{Fe}$  por células Caco-2 control o células Caco-2 lipofectadas con los plasmidios portadores de los genes antisentido contra DMT-1 medida a los 12 días postconfluencia;  $n = 3$ . Las diferencias observadas no son significativas,  $p > 0,05$ .

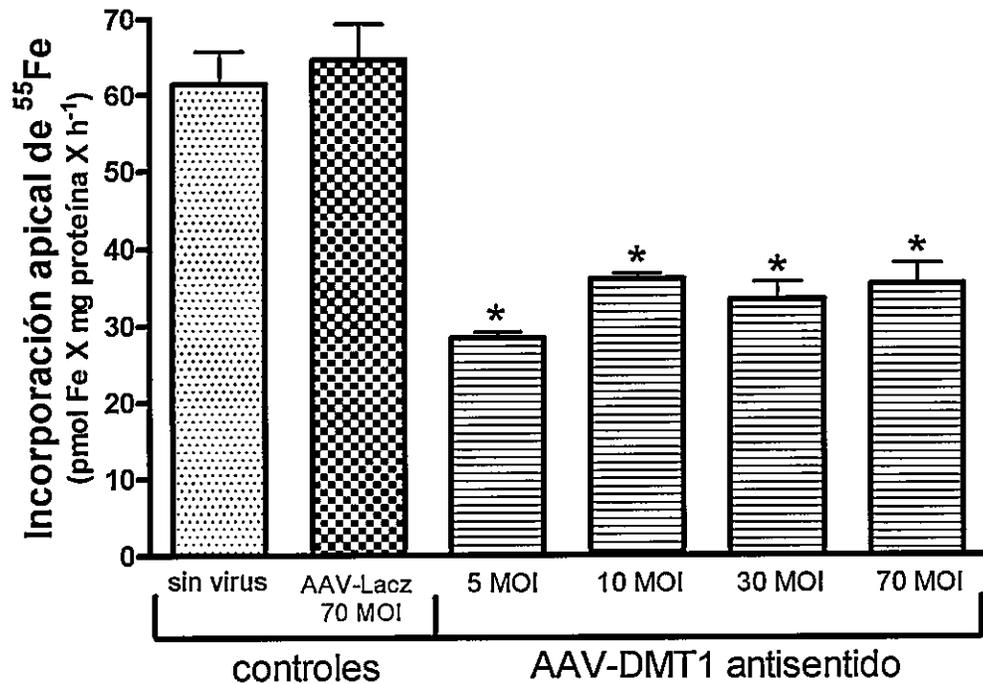
## Producción



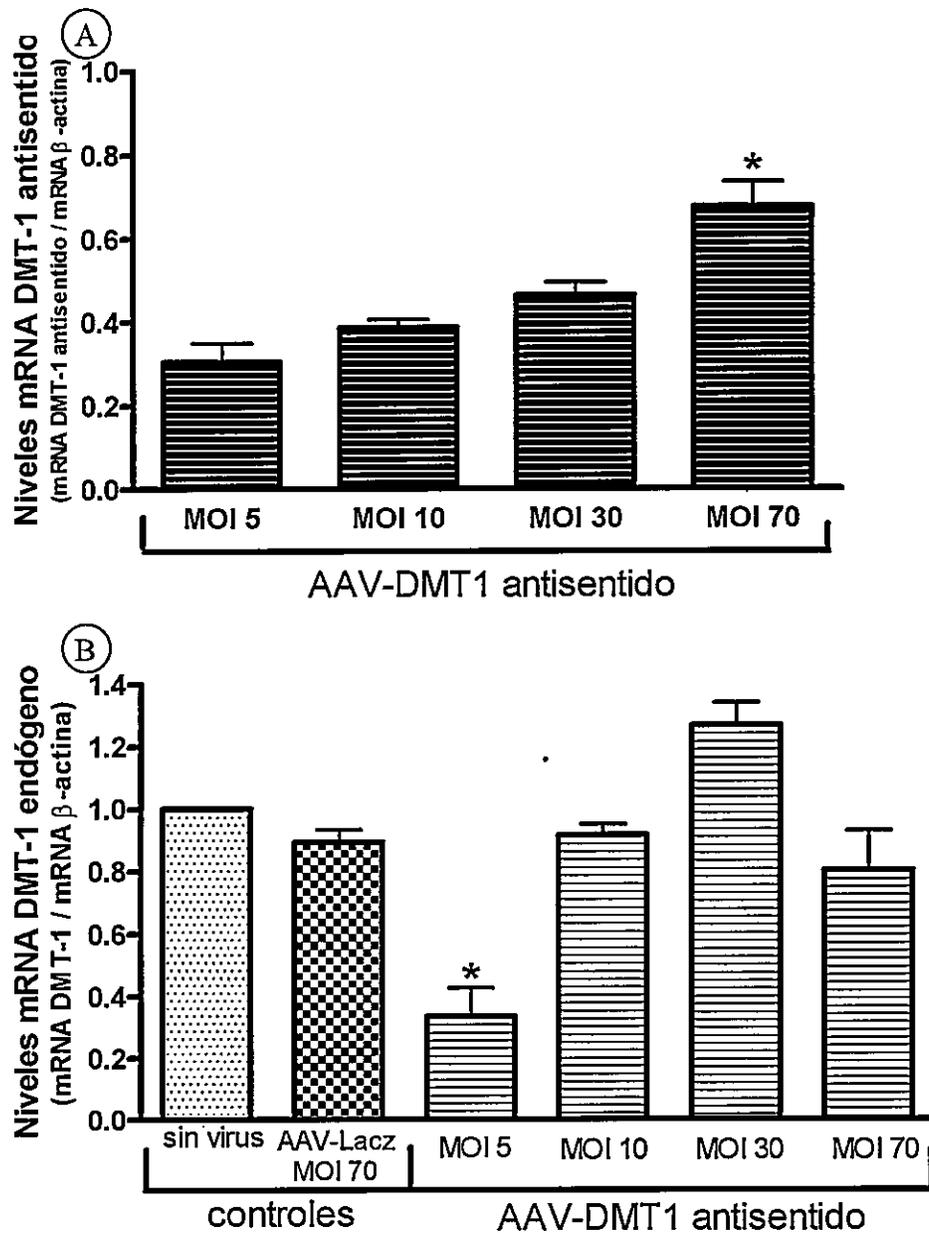
## Purificación



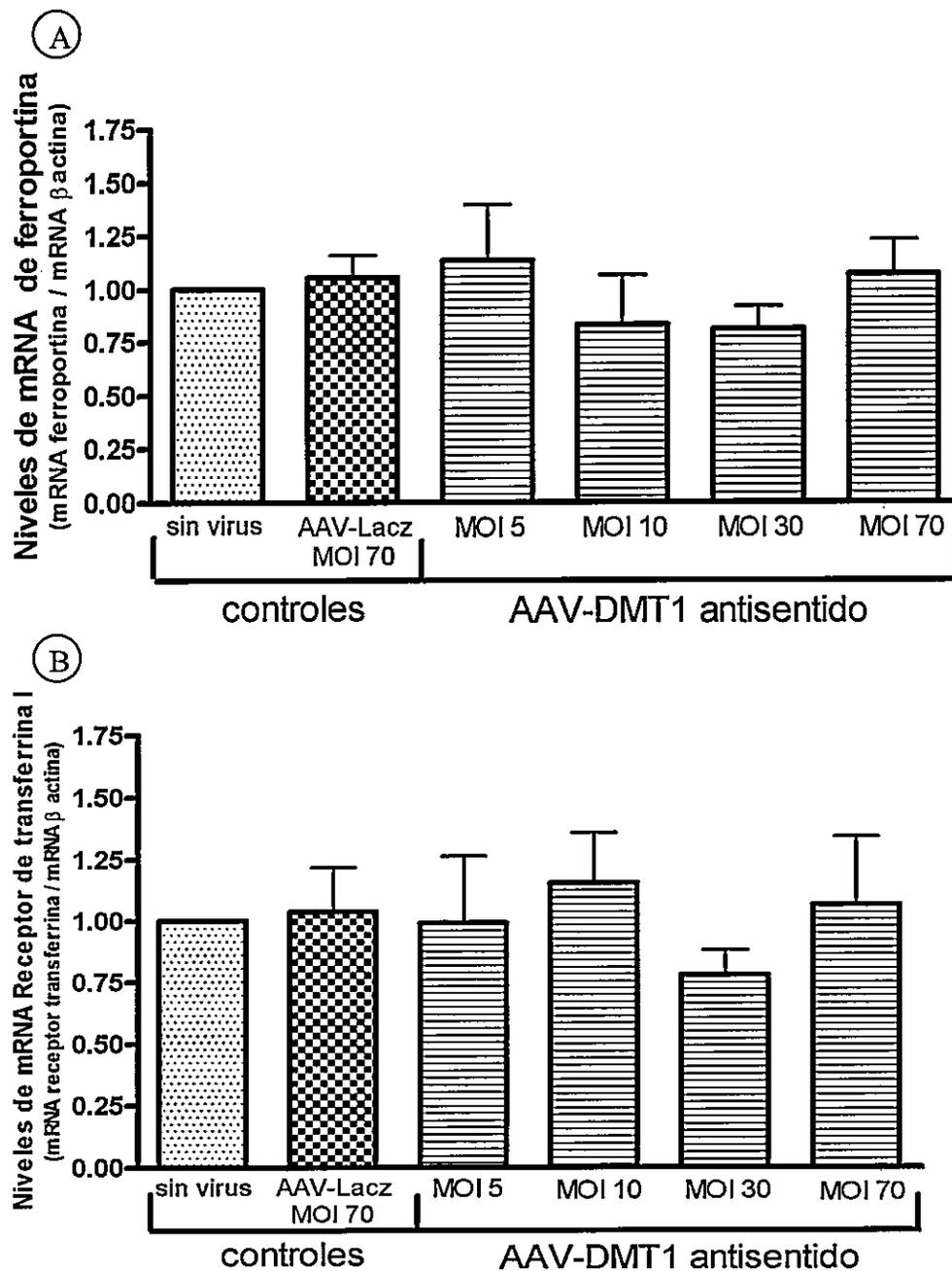
**Figura 3.2 Producción de partículas virales AAV: Pasos seguidos para la producción y posterior purificación de partículas virales AAV conteniendo los genes antisentido contra DMT-1.**



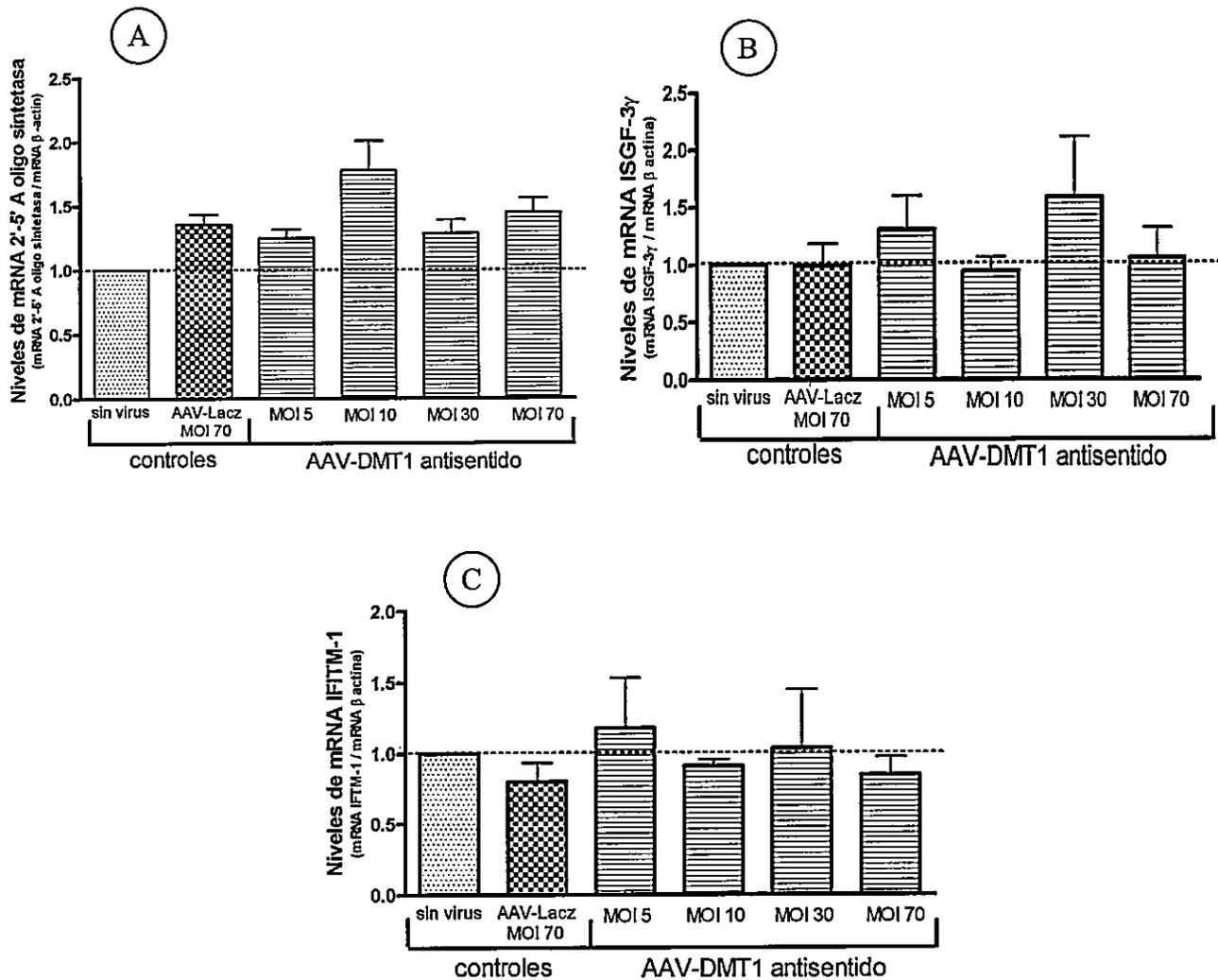
**Figura 3.3 Inhibición de la incorporación de hierro mediada por AAV antisentido:** Se transdujeron células Caco-2 en cultivo con diferentes dosis (MOIs) del AAV antisentido parcial contra DMT-1 o del AAV-Lacz. A los 12 días postransducción se evaluó la incorporación apical de <sup>55</sup>Fe incubando a las células con 1  $\mu$ M de <sup>55</sup>Fe-NTA durante 1h. Los resultados se expresaron como pmoles de hierro incorporado por mg de proteína; n = 3; p < 0,001 t-test vs. control sin virus.



**Figura 3.4 Mecanismos de acción de los genes antisentido generados:**  
 A) Cuantificación por RT-PCR del nivel de expresión del gen antisentido parcial contra DMT-1 en células Caco-2 transducidas con distintas concentraciones (MOIs) del vector viral AAV-DMT1 antisentido parcial;  $n = 3$ ;  $p < 0,05$  t-test vs. MOI 5.  
 B) Cuantificación por RT-PCR del gen DMT-1 endógeno en células Caco-2 transducidas con distintas concentraciones (MOIs) de los vectores virales AAV-DMT1 antisentido parcial o AAV-Lacz;  $n = 3$ ;  $p < 0,01$  t-test vs. control sin virus.



**Figura 3.5** Expresión de los transportadores de hierro en células con baja incorporación apical del metal: Cuantificación por RT-PCR semicuantitativa del nivel de expresión del gen *ferroportina* (A) y receptor de transferrina I (B) en células Caco-2 transducidas con diferentes dosis del vector viral AAV-DMT1 antisentido parcial o AAV-LacZ;  $n = 3$ .



**Figura 3.6 Ausencia de activación de la vía del interferón por un gen antisentido parcial contra DMT-1: Cuantificación de los niveles de mRNA de A) 2'-5' A oligonucleótido sintetasa; B) ISGF-3 $\gamma$  y C) IFITM-1 determinados por RT-PCR semicuantitativa a partir de RNA extraído de células Caco-2 transducidas con diferentes dosis de vectores virales AAV-DMT1 antisentido parcial o AAV-LacZ; n = 3.**

## DISCUSIÓN

Usualmente la hemocromatosis hereditaria es diagnosticada después de la aparición de los síntomas, en la quinta o sexta década de vida, momento en el cual los pacientes ya presentan una sobrecarga de hierro muy elevada (Brittenham y col. 2000). Hasta el momento, el único tratamiento aplicado a pacientes con HH consiste en la eliminación de parte del hierro circulante a través de la extracción de grandes volúmenes de sangre a espacios regulares de tiempo (flebotomía). Si bien, realizado a tiempo, este es un procedimiento efectivo contra la HH, también genera una importante reducción en la calidad de vida del paciente, ya que este debe someterse al tratamiento de flebotomía de por vida, con el consiguiente riesgo de desarrollar infecciones recurrentes debido a la reducción de la neutropenia.

Diversas evidencias experimentales indican que DMT-1 es la principal vía de entrada de hierro en las células intestinales; por ejemplo, tanto los modelos de ratones microcíticos *mk* como las ratas Belgrade b, que poseen una mutación inactivante en el gen que codifica para DMT-1, desarrollan una severa deficiencia corporal de hierro (Fleming y col. 1997; Fleming y col. 1998). De igual forma, ratones knockout para HFE desarrollan un fenotipo de marcada sobrecarga de hierro, mientras que ratones doble knockout  $HFE^{-}/DMT1^{-}$  no presentan los síntomas de exceso del metal (Levy y col. 2000). Estos datos experimentales han llevado a postular que el desarrollo de un fármaco capaz de inhibir selectivamente la acción de DMT-1 en la membrana apical del enterocito sería de gran utilidad en el tratamiento de cualquier forma de hemocromatosis hereditaria, independientemente de su etiología (Levy y col. 2000). En el presente trabajo desarrollamos vectores virales AAV que portan dos genes antisentido, de diferente extensión, dirigidos contra el mRNA del transportador de

hierro DMT-1. Se escogió especialmente el uso de vectores virales AAV ya que ellos permiten una entrega eficiente de los genes terapéuticos a las células intestinales pero principalmente debido a que estos son los únicos vectores virales capaces de resistir el pH ácido del estómago, abriendo la posibilidad de administrar los genes antisentido por vía oral, favoreciendo la llegada del transgén al epitelio intestinal.

En un trabajo de gran relevancia During y colaboradores demostraron que la administración oral de vectores virales AAV conteniendo el gen de la  $\beta$ -galactosidasa permitió su expresión en el intestino delgado por periodos superiores a los 6 meses (During y col. 1998). Debido a la elevada tasa de recambio que sufren las células intestinales, la prolongada duración en la expresión de este transgén sugiere claramente que las células progenitoras en las criptas intestinales, normalmente encargadas de la generación de nuevos enterocitos absortivos, también fueron transducidas por la administración oral del AAV. En ese trabajo también se demostró que la transducción viral se limita sólo al tejido gastrointestinal, sin observarse diseminación del vector viral hacia otros tejidos.

En nuestros experimentos observamos que la transducción de las células intestinales Caco-2 con los vectores virales AAV-DMT1 antisentido produjo una reducción del 50-60 % en la incorporación apical de hierro. Si bien el uso de concentraciones crecientes de partículas virales produjo un aumento significativo en los niveles de RNA antisentido no se observaron modificaciones mayores en el nivel de absorción del metal, indicando que la máxima inhibición de la expresión de DMT-1 había sido alcanzada aún con la dosis viral más baja utilizada. Probablemente, la incorporación residual de hierro observada se deba a la acción de otros mecanismos de absorción de hierro independientes de DMT-1 (Conrad y col. 1992; Conrad y col.

2000) y por lo tanto no susceptible a ser inhibidos por los antisentidos generados. De esta manera, el nivel real de inhibición de la incorporación apical de hierro aquí reportado podría estar subestimado. Algunos datos que apoyan esta afirmación provienen de un trabajo anterior (Bannon y col. 2003) en el que se generaron clones de células Caco-2 que expresan una ribozima destinada a degradar el mRNA de DMT-1. En estos experimentos se obtuvo una reducción en la incorporación apical de hierro del 50 % (valor similar al aquí obtenido), a pesar de que se observó una reducción casi completa en los niveles de mRNA del transportador, apoyando la idea de la existencia de otros transportadores distintos a DMT-1 en las células Caco-2. Sin embargo, otra posibilidad es que debido a que las células en el cultivo se encuentran en distintas fases del ciclo celular, alguna sub-población de células podría no ser susceptible a ser transducida por los vectores virales AAV en los tiempos de infección aquí utilizados (8 h). En este caso, la incorporación residual de hierro observada se debería a la entrada de hierro mediada por DMT-1 en las células no transducidas con los vectores AAV-DMT1 antisentido.

Inesperadamente, las células transducidas con la dosis viral más baja de AAV-DMT1 antisentido (MOI = 5) mostraron una marcada reducción en el nivel de mRNA de DMT-1 endógeno, el que no fue afectado al aumentar la dosis viral utilizada. Este fenómeno podría deberse a un efecto tipo RNAi, en donde las moléculas híbridas, formadas por la unión del RNA sentido con el RNA antisentido, serían procesadas por la ribonucleasa Dicer (Hannon 2002); sin embargo, otra posibilidad es que el genoma de cadena simple del AAV este actuando por si mismo como una molécula antisentido a través de un mecanismo de acción mediado por la RNasa H, la que es capaz de reconocer y degradar la molécula de RNA del híbrido RNA/DNA (Aboul-Fadi 2005). Por

el contrario, el efecto obtenido al aumentar el nivel de expresión del gen antisentido (MOI 10-70) parece ser principalmente de ocupación (y bloqueo de la traducción) del mRNA de DMT-1, ya que se observan niveles normales de mRNA de DMT-1 pero la incorporación apical de hierro continúa disminuida.

Las células intestinales son capaces de aumentar, por acción del sistema IRP/IRE, la traducción del mRNA de DMT-1 cuando la concentración interna de hierro es baja (Wojcik y col. 2002). En el caso de la transducción con los vectores AAV antisentido este mecanismo regulatorio fue claramente anulado, ya sea por la degradación del transcrito a bajas dosis virales o por la ocupación del mismo a dosis mayores, favoreciendo el posible uso de estos vectores virales en una futura terapia contra la hemocromatosis hereditaria.

Se ha postulado que ferroportina y el receptor de transferrina I también responden a cambios en las concentraciones de hierro presentes en el enterocito (Casey y col. 1989; McKie y col. 2000); por este motivo analizamos la expresión de estos genes en células Caco-2 que poseen un nivel de incorporación apical de hierro reducido debido al bloqueo de la expresión de DMT-1. Contrariamente a lo esperado, no se observaron variaciones significativas en la expresión de estos genes con respecto a los niveles hallados en las células control; estos datos sugieren que a pesar de que DMT-1 se encuentra inhibido, la concentración intracelular de hierro habría retornado a valores normales, posiblemente mediante la entrada de hierro unido a transferrina por la ruta basolateral. Esta observación podría corroborarse midiendo, en forma directa, la concentración de hierro presente en el interior de estas células.

Hay trabajos que indican que en ciertos tipos celulares la presencia de RNA doble cadena, como los formados por la unión del RNA sentido con el RNA antisentido,

es capaz de disparar la activación de un mecanismo de defensa antiviral (sistema del interferón) que finalmente conduce a la célula a una muerte por apoptosis. En el presente trabajo se evaluó la expresión de tres genes pertenecientes a la vía del interferón y cuya expresión, en otros estudios en los que se generaron híbridos de RNA, aumenta de 50 a 500 veces al producirse la activación de esta vía; estos son: i) la enzima 2'-5' A oligonucleótido sintetasa, ii) la proteína transmembrana inducible por interferón IFITM-1 y iii) el factor de transcripción ISGF-3 $\gamma$ . Ninguno de los genes analizados aumento significativamente su expresión en las células Caco-2 transducidas con los vectores AAV portadores del gen antisentido parcial contra DMT-1, indicando que los posibles efectos tóxicos producidos por la activación de esta vía no son inducidos por la administración de un gen antisentido corto contra DMT-1, favoreciendo el posible uso de estos vectores virales en el desarrollo de una terapia para el tratamiento de la hemocromatosis hereditaria.

La inhibición de la expresión de DMT-1 también sería de gran utilidad en el tratamiento de otras enfermedades, en donde una acumulación excesiva de hierro potencia la generación de especies reactivas del oxígeno inducidas por otras moléculas como es el caso de la cirrosis alcohólica en humanos (Fletcher y Powell 2003) y de los modelos de daño hepático inducido por alcohol en animales (Xiong y col. 2003). Recientemente se ha demostrado que DMT-1 también transporta cobre (Arredondo y col. 2003), por lo que una reducción en su expresión también sería de gran utilidad en la disminución del daño hepático producido en la enfermedad de Wilson, una patología en la que la homeostasis del cobre se encuentra alterada.

Por otro lado, este modelo de reducción de la expresión de DMT-1 podría ser utilizado para identificar cuales son todos los metales transportados, en condiciones

fisiológicas, por este transportador convirtiéndose en un buen modelo para el estudio de la incorporación tanto de metales esenciales como de metales tóxicos en células intestinales humanas.

## **CAPÍTULO IV**

### **INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FERROPORTINA POR AAV ANTISENTIDO**

#### **INTRODUCCIÓN**

El transporte de hierro desde el enterocito hacia la circulación sanguínea, por medio del transportador ferroportina es uno de los puntos de control claves en la regulación de la homeostasis corporal del hierro; este transportador es una proteína transmembrana de 571 aminoácidos fuertemente expresada en la membrana basolateral de los enterocitos, en la membrana basal de las células de la placenta, en las células de Kuffer y en los macrófagos residentes del bazo. Allí ferroportina interviene en el transporte del hierro absorbido por el intestino hacia la sangre, en el transporte del hierro de la madre al feto y en el reciclaje del hierro captado por los macrófagos en el proceso de destrucción de eritrocitos senescentes respectivamente (Abboud y Haile 2000; Donovan y col. 2000; McKie y col. 2000).

<sup>4</sup> Diversas evidencias experimentales han postulado a ferroportina como el principal exotransportador de hierro en eucariontes: por ejemplo, la inactivación de ambos alelos de ferroportina tanto en pez cebra (Donovan y col. 2000) como en ratones (Donovan y col. 2005) produce una letalidad embrionaria temprana debida a la inhibición de la transferencia de hierro materno fetal, mientras que la inactivación selectiva de la expresión de este transportador en el epitelio intestinal de ratones adultos genera animales con una severa deficiencia de hierro acompañada de la acumulación del metal en el interior de los enterocitos (Donovan y col. 2005). En otros experimentos, la inhibición de la expresión de ferroportina en macrófagos humanos,

mediante técnicas de RNAi, redujo significativamente (65-95 %) la salida del hierro incorporado por estas células, provocando un importante aumento en la concentración intracelular del metal (Galli y col. 2004), mientras que la sobreexpresión de ferroportina en macrófagos produjo un claro aumento en la salida de hierro (Knutson y col. 2005). Estos resultados apoyan la idea de que ferroportina es el principal exotransportador de hierro tanto en células intestinales como en macrófagos (Ganz 2005a).

Uno de los descubrimientos más importantes que ha ayudado a entender los mecanismos de regulación de la homeostasis corporal del hierro fue el descubrimiento de hepcidina, un péptido altamente expresado y secretado por el hígado en condiciones de sobrecarga de hierro e inflamación y cuya expresión es inhibida en condiciones de deficiencia de hierro o hipoxia (Nicolas y col. 2002b; Ganz 2003). Ratones knockout para hepcidina desarrollan síntomas de sobrecarga de hierro similares a los observados en pacientes con hemocromatosis hereditaria (Nicolas y col. 2001; Nicolas y col. 2002a), mientras que ratones transgénicos que sobreexpresan este péptido en el hígado presentan una deficiencia severa de hierro (Nicolas y col. 2002a), sugiriendo una regulación recíproca entre la expresión de hepcidina y la absorción del metal.

Recientemente se demostró, en células de origen renal y macrofágicas, que hepcidina es capaz de regular la concentración de ferroportina en la membrana celular uniéndose a este transportador e induciendo su internalización y posterior degradación (Nemeth y col. 2004). Debido a que ferroportina además de en el duodeno también se expresa en macrófagos y en células de la placenta, el aumento de la expresión de hepcidina y la consiguiente degradación de ferroportina en situaciones de sobrecarga corporal del metal, además de inhibir la liberación del hierro reciclado por los

macrófagos y el transporte de este metal a través de la placenta, podría también inhibir la absorción intestinal de hierro (Nicolas y col. 2002b; Ganz 2003), generando una regulación sistémica de la concentración plasmática de hierro en respuesta a las demandas corporales del metal (Ganz 2005b).

En humanos, al menos 12 mutaciones independientes en el gen que codifica para ferroportina han sido asociadas a condiciones de sobrecarga de hierro similares a las descritas en HH (Nelson y Kowdley 2005; Pietrangelo 2005); sin embargo, a diferencia de los otros tipos de HH, las mutaciones en ferroportina generan una enfermedad de tipo autosómica dominante. Los síntomas hallados en pacientes con mutaciones en ferroportina son bastante heterogéneos, por un lado un grupo de pacientes se caracteriza por una deposición de hierro principalmente en macrófagos, con elevados niveles de ferritina sérica a pesar de tener niveles de saturación de transferrina normales (Pietrangelo 2004) mientras que otro grupo presenta síntomas muy similares a las otras formas de HH, con un elevado porcentaje de saturación de transferrina y la deposición de hierro principalmente en hepatocitos (Wallace y col. 2004; Sham y col. 2005).

Aún se desconoce la relación que existe entre las mutaciones en ferroportina y los síntomas de sobrecarga de hierro; sin embargo, algunos investigadores han postulado que estas mutaciones producen la pérdida de la función de ferroportina generando un modelo de haploinsuficiencia, en donde, debido a la baja dosis del metal incorporado por los enterocitos (1-2 mg diarios) la presencia de un alelo silvestre y un alelo mutado sería suficiente para mediar la absorción de hierro en estas células, pero no sería suficiente para mediar un eficiente reciclaje del hierro presente en macrófagos donde la cantidad de hierro transportado es mucho mayor (30 mg diario),

quedando el metal atrapado al interior de los macrófagos (Fleming y Sly 2001; Montosi y col. 2001). En este modelo, la falta de hierro circulante restringiría fuertemente la eritropoiesis generando señales destinadas a aumentar la absorción intestinal del metal.

Una posibilidad alternativa es que las mutaciones en ferroportina produzcan un efecto de tipo dominante negativo, en el que la incorporación de la proteína mutada a la membrana plasmática produzca la pérdida de la función de la proteína silvestre; datos que apoyan este modelo provienen de experimentos en los que se observó que ferroportina es capaz de actuar como multímero, y que la forma mutada de la proteína puede multimerizar con la forma normal afectando su función (Aguirre y col. 2005; De y col. 2005). Trabajos recientes en donde se analizó el efecto de las mutaciones en ferroportina descritas en humanos, incorporando a células en cultivo distintas variantes del gen *ferroportina* conteniendo las mutaciones antes mencionadas, han permitido clasificarlas en dos categorías distinguibles por el fenotipo de la enfermedad producida: i) mutaciones que producen la pérdida de la capacidad del transporte de hierro; en este caso las mutaciones impiden el correcto plegamiento de la proteína disminuyendo su abundancia en la membrana, generando un fenotipo de retención de hierro por macrófagos y elevados niveles de ferritina sérica y ii) mutaciones que producen la pérdida de la capacidad de interacción con hepcidina, en este caso las mutaciones mantienen la capacidad de la proteína de exportar hierro pero impiden la interacción de ferroportina con hepcidina, por lo que no se produce la degradación de este transportador en presencia de altas concentraciones de hierro. A diferencia de las mutaciones anteriores, en este caso se observan síntomas similares a los descritos para las otras formas de HH, caracterizados por elevados niveles de absorción

intestinal de hierro, altos niveles de saturación de transferrina y el depósito de hierro principalmente en hepatocitos (De, y col. 2005; Schimanski y col. 2005).

### **Inhibición de la expresión de ferroportina en el intestino**

Ferroportina es el principal exotransportador de hierro en células intestinales y, al igual que DMT-1, su expresión se encuentra significativamente aumentada en los enterocitos de pacientes con HH, por lo que una terapia tendiente a reducir la expresión intestinal de este transportador debería disminuir la transferencia de hierro desde el enterocito a la sangre. Una terapia de este tipo debería ser muy eficiente en el tratamiento de la HH, debido a que la inhibición de la expresión de ferroportina produciría una acumulación del hierro en el interior del enterocito, el que por acción del sistema IRP/IRE debería disminuir la incorporación apical de hierro por inhibición de la expresión del transportador DMT-1, produciéndose así un efecto inhibitorio dual muy potente.

Los objetivos del presente capítulo son i) desarrollar vectores virales AAV portadores de genes antisentido contra en mRNA del transportador ferroportina; ii) evaluar los niveles de incorporación apical y transferencia basolateral de hierro en células Caco2 transducidas con los vectores virales AAV-ferroportina antisentido y iii) medir los niveles de expresión de ferroportina y DMT-1 en células Caco-2 transducidas con distintas dosis de los vectores AAV antisentido; poniendo a prueba la siguiente hipótesis de trabajo:

*La inhibición específica de la expresión del transportador de hierro ferroportina en células Caco-2 produce un aumento en la concentración intracelular de hierro, lo que*

*conduce, mediante acción del sistema IRP/IRE y de HFE a una disminución en la expresión y/o actividad del transportador apical DMT-1.*

## RESULTADOS

### **4.A) Producción de genes antisentido contra el transportador ferroportina**

Con el uso de técnicas de biología molecular se desarrollaron dos genes antisentido contra el mRNA del transportador de hierro ferroportina humano. Uno de los genes antisentido corresponde a una secuencia parcial interna de 249 pb del cDNA de ferroportina (pAAV-AS1-Ferroportina) mientras que el otro corresponde a la secuencia completa (1890 pb) del cDNA de ferroportina (pAAV-AS2-Ferroportina). Ambas secuencias se colocaron en orientación invertida con respecto al promotor del CMV en el plasmidio pAAV-MCS, que permite la posterior producción de partículas virales AAV.

### **4.B) Plasmidios: evaluación de la expresión de los genes antisentido**

Para evaluar la expresión de los genes antisentido producidos se lipofectaron células Caco-2 con los plasmidios portadores de las distintas construcciones antisentido y se midió su expresión por RT-PCR; **Figura 4.1** (página 88).

En este experimento se observó que tanto el gen antisentido completo como el gen antisentido parcial se expresan en las células lipofectadas. No se evaluó la inhibición en la salida basolateral de hierro debido a que, por factibilidad de la técnica, las lipofecciones se realizaron en células cultivadas en placas y no en insertos bicamerales.

#### **4C) AAV: producción de vectores virales AAV portadores de genes antisentido contra ferroportina.**

Para la producción de los mencionados vectores virales se utilizó el mismo protocolo experimental descrito en el capítulo II.

#### **4D) Inhibición de la salida basolateral de hierro mediada por AAV-ferroportina antisentido.**

Para evaluar el posible efecto inhibitorio de los AAV antisentidos en la salida basolateral de hierro, se incubaron células Caco-2 cultivadas en insertos bicamerales (permiten acceso diferencial al compartimento apical o basolateral) con distintas concentraciones (MOIs) de partículas virales antisentido contra el mRNA del transportador ferroportina o con AAV portadores del gen *Lacz* (virus control). Después de la transducción con los vectores AAV las células fueron cultivadas durante 12 días hasta obtener una completa diferenciación celular y se evaluó la incorporación apical de  $^{55}\text{Fe}$  y la transferencia basolateral del metal; **Figura 4.2** (página 87). En estos experimentos se utilizó el vector viral AAV que porta el gen antisentido parcial contra ferroportina ya que en ensayos preliminares se observó que este vector es más eficiente en reducir la transferencia basolateral de hierro que el vector que porta el gen antisentido completo.

En estos experimentos, considerando una actividad específica del hierro constante, se observó que las células tratadas con diferentes dosis de AAV-ferroportina antisentido mostraron una inhibición cercana al 35 % en la salida basolateral de hierro, sugiriendo una disminución parcial en la expresión de este transportador. Contrariamente a lo esperado, la reducción en la salida basolateral de

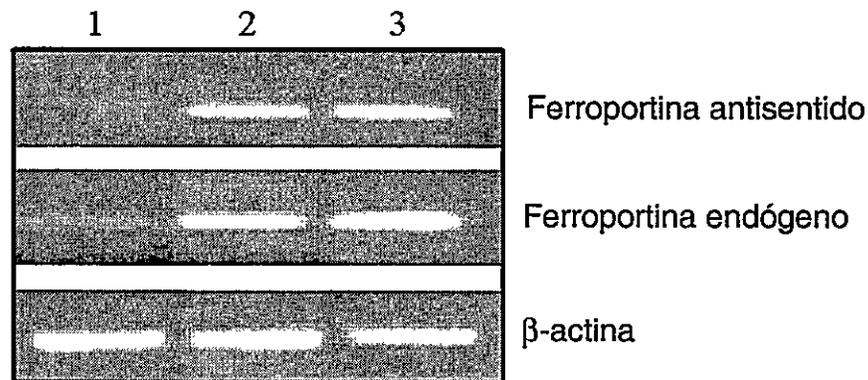
hierro se correlacionó con un aumento en la incorporación apical del metal (ver discusión).

#### **4.E) Expresión de DMT-1 y ferroportina en células Caco-2 transducidas con AAV-ferroportina antisentido.**

Para evaluar la expresión de los genes que codifican para DMT-1 y ferroportina se realizaron reacciones de RT-PCR a partir de RNA total extraído de células Caco-2 transducidas con los vectores virales AAV que portan el gen antisentido contra ferroportina (salida basolateral de hierro reducida) o transducidas con un vector viral AAV control; **Figura 4.3** (página 88).

En estos experimentos no se observaron variaciones significativas en los niveles de mRNA de ambos transportadores en células transducidas con los vectores virales AAV-ferroportina antisentido en comparación a los niveles presentes en las células control.

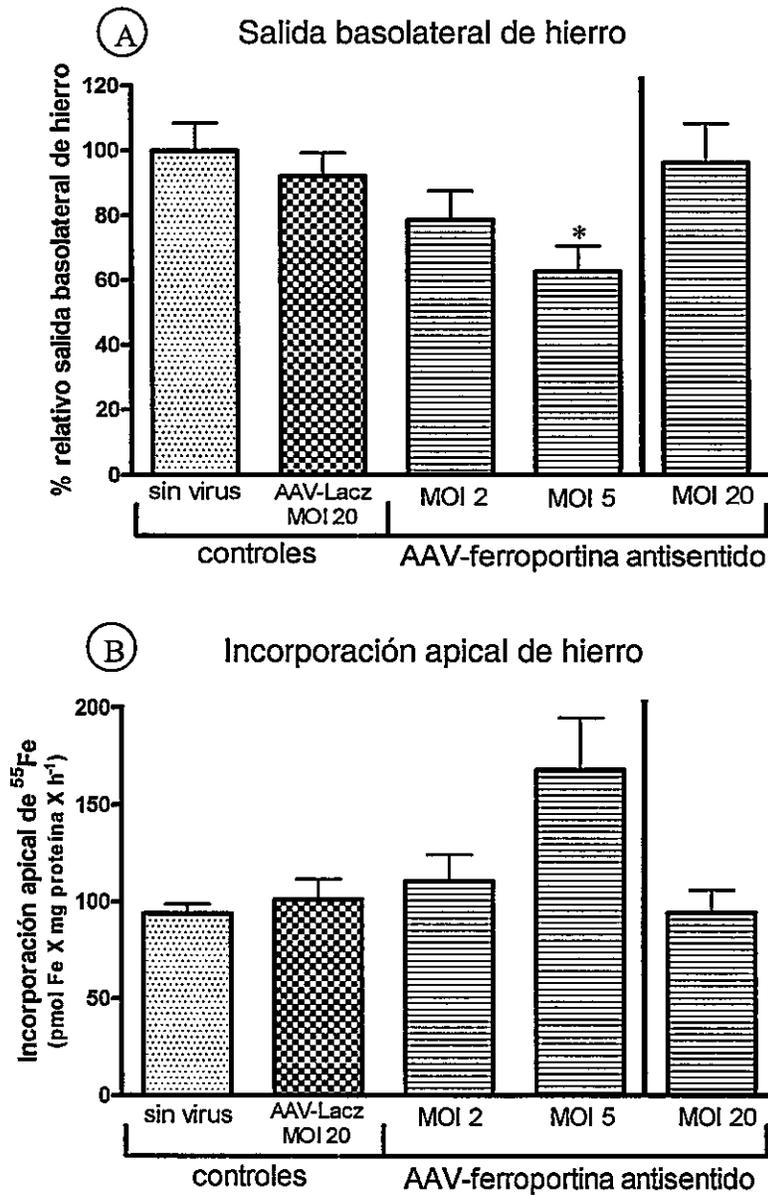
## FIGURAS



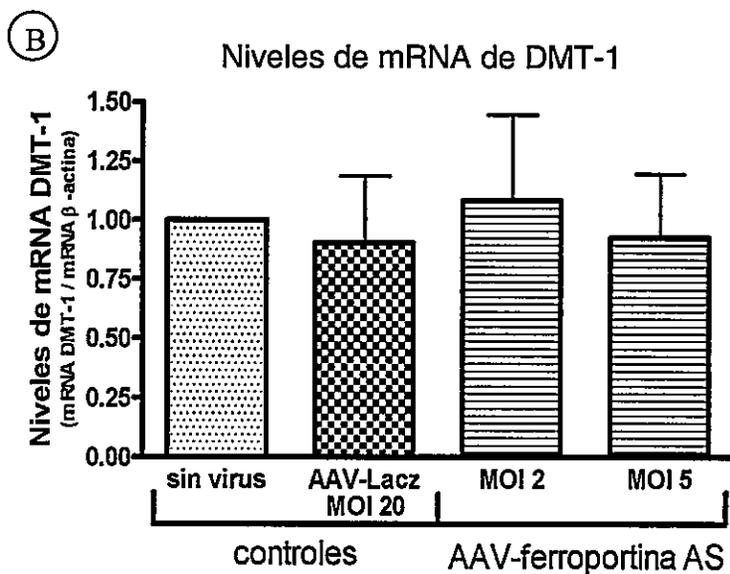
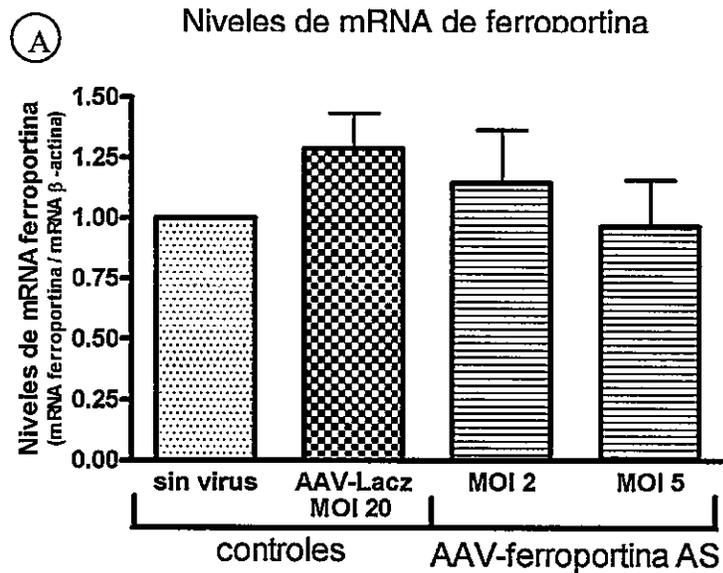
- 1) control Caco-2 sin lipofectar
- 2) lipofección Caco-2 con pAAV-AS1-Ferroportina
- 3) lipofección Caco-2 con pAAV-AS2-Ferroportina

**Figura 4.1 Evaluación de la expresión de los genes antisentido contra el mRNA del transportador ferroportina: RT-PCR a partir del RNA total extraído de células Caco-2 control (sin lipofectar) o células Caco-2 lipofectadas con los plasmidios pAAV-AS1-Ferroportina (gen antisentido parcial contra ferroportina) y pAAV-AS2-Ferroportina (gen antisentido completo contra ferroportina). Los partidores utilizados amplifican un fragmento de 190 bases presente tanto en el RNA antisentido parcial como en el RNA antisentido completo.**

---



**Figura 4.2 inhibición de la salida basolateral de hierro mediada por AAV-ferroportina antisentido:** Se transdujeron células Caco-2 en cultivo con diferentes dosis (MOIs) del AAV antisentido parcial contra ferroportina o del AAV-Lacz. A los 12 días postransducción se evaluó A) la salida basolateral de <sup>55</sup>Fe, expresada como porcentaje relativo de salida con respecto al hierro incorporado y B) la incorporación apical de hierro expresada como pmoles de hierro incorporado por mg de proteína; n = 6; p < 0,05 t-test vs. control sin virus.



**Figura 4.3.** Expresión de los transportadores de hierro en células con bajo porcentaje de salida basolateral del metal: Cuantificación por RT-PCR del nivel de expresión del gen ferroportina (A) y DMT-1 (B) en células Caco-2 transducidas con diferentes dosis del vector viral AAV-ferroportina antisentido parcial o AAV-Lacz;  $n = 3$ .

## DISCUSIÓN

Ferroportina, al ser el principal exotransportador de hierro presente en el enterocito, es un blanco ideal para el diseño de una terapia para el tratamiento de la hemocromatosis hereditaria. La reducción de la expresión de este transportador debería producir un efecto inhibitorio muy importante en la salida del hierro absorbido por el enterocito, generando una acumulación del metal en el interior celular. En este caso, las células intestinales deberían detectar el aumento de la concentración intracelular de hierro y responder a él mediante una reducción en la expresión del transportador apical DMT-1, disminuyendo aún más el exotransporte de hierro hacia el plasma. Debido a que el enterocito absorbivo posee una vida media muy corta (3 días) el exceso de hierro acumulado en su interior sería posteriormente eliminado en el proceso normal de descamación intestinal, evitándose así los efectos tóxicos de una acumulación sistémica del metal.

En el presente trabajo se transdujeron células intestinales Caco-2, cultivadas en insertos bicamerales, con diferentes concentraciones de vectores virales AAV portadores de un gen antisentido contra el mRNA de ferroportina, observándose una reducción en la salida basolateral de hierro cercana al 35 % al utilizar una dosis viral de 5 MOI. Estos datos indican que un gen antisentido dirigido contra el mRNA del transportador ferroportina es capaz de disminuir significativamente la salida de hierro en células intestinales; sin embargo, dado que la reducción obtenida no fue tan pronunciada como la que cabría esperar, es probable que el efecto inhibitorio obtenido con el gen antisentido sea sólo parcial o que en células Caco-2 exista algún otro mecanismo de salida de hierro independiente a ferroportina y por lo tanto no susceptible a ser inhibido por el gen antisentido. Al aumentar la dosis viral (MOI 20) no

se observó una reducción en la salida basolateral de hierro. Este es un fenómeno frecuentemente observado al utilizar dosis virales muy elevadas, ya que una alta concentración viral puede producir efectos tóxicos y muerte de las células transducidas, por lo que finalmente la medición de la salida de hierro se realiza en las células no transducidas que sobrevivieron al proceso (se obtuvieron valores similares a los hallados en las células control).

Se ha postulado que las células intestinales son capaces de responder a las concentraciones intracelulares de hierro regulando la expresión de los transportadores DMT-1 y ferroportina (Talkvist y col. 2000; Zoller y col. 2002; Johnson y col. 2005), por lo que la inhibición de la expresión de ferroportina debería producir un aumento en la concentración intracelular de hierro, el que por acción del sistema IRE/IRP debería conducir a una reducción en la expresión de DMT-1 y en la incorporación apical del metal. Sin embargo, en estos experimentos la inhibición de la salida de hierro se correlacionó con una mayor incorporación apical del metal y no se observaron variaciones significativas en los niveles de mRNA tanto del transportador ferroportina como del transportador DMT-1, sugiriendo que la acumulación de hierro en estas células no es suficiente para producir una desactivación del sistema regulatorio IRP/IRE o para producir la activación de algún otro mecanismo de regulación capaz de reducir el nivel de mRNA de ambos transportadores. Una posibilidad alternativa es que el aumento en la concentración intracelular de hierro produzca algún efecto a nivel de la distribución de estos transportadores entre la membrana plasmática y compartimentos celulares internos, fenómeno no evaluado en estos experimentos, y que ya ha sido descrito en otros trabajos (Sharp y col. 2002)

Debido a que el gen antisentido contra ferroportina utilizado en estos experimentos es de un tamaño similar al utilizado para inhibir la expresión de DMT-1 es muy probable que su uso no produzca la activación del mecanismo de respuesta antiviral del interferón, tal como se describió en el capítulo III para el uso del gen antisentido contra DMT-1.

En el desarrollo de una terapia tendiente a reducir la expresión de ferroportina es muy importante realizar una entrega direccionada del gen terapéutico sólo a las células intestinales, ya que una inhibición generalizada de la expresión de ferroportina produciría una reducción del reciclaje del hierro incorporado por macrófagos, conduciendo al desarrollo de un fenotipo similar al observado en pacientes con hemocromatosis hereditaria debida mutaciones en ferroportina (HH tipo IV).

La reducción de la incorporación apical de hierro (por inhibición de la expresión de DMT-1) y en la salida basolateral del metal (por inhibición de la expresión de ferroportina) observadas en este trabajo avalan el desarrollo de un vector AAV que porte, en un mismo genoma, un gen antisentido contra DMT-1 junto con un gen antisentido contra ferroportina, lo que debiera resultar en un potenciamiento de los efectos inhibitorios aquí observados.

## **SEGUNDA PARTE**

**Desarrollo de un nuevo sistema de corrección génica  
con posible utilidad en el tratamiento de la  
hemocromatosis hereditaria**

## **CAPÍTULO V**

### **DESARROLLO DE UN NUEVO SISTEMA DE CORRECCIÓN GÉNICA**

#### **INTRODUCCIÓN**

La capacidad de corregir mutaciones puntuales que generan enfermedades ha sido considerada durante mucho tiempo como el máximo objetivo de la terapia génica. La base de datos OMIM contiene más de 400 enfermedades producidas por mutaciones puntuales, en donde el cambio de una sola base en el DNA puede (i) generar un codón de termino, produciendo una proteína trunca, (ii) abolir una señal de procesamiento, generando una proteína anormal o (iii) cambiar un codón, produciendo un cambio aminocídico que se refleja en una proteína inactiva, como es el caso de la mutación C282Y en HFE previamente descrita para la hemocromatosis hereditaria.

Diferentes estudios han sugerido que es posible reparar (o inducir) una mutación puntual en células eucariotas activando, en forma experimental, los procesos de recombinación homóloga o de corrección de pares anómalos, normalmente presentes en todas las células.

Para alcanzar este objetivo se han desarrollado variadas estrategias experimentales con diferentes grados de éxito (Igoucheva y Yoon 2000; Rice y col. 2001). Los primeros trabajos se iniciaron con los estudios de Kmiec y colaboradores quienes en el año 1996 reportaron la corrección de mutaciones puntuales en DNA episomal utilizando oligonucleótidos sintéticos híbridos de RNA/DNA (Yoon y col. 1996); estas moléculas correctoras, llamadas quimeroplastos, estaban diseñadas para unirse de forma específica al DNA blanco e inducir el reconocimiento y la corrección de la base mutada por acción de los sistemas naturales de reparación del DNA. Este tipo

de molécula ha sido utilizada posteriormente para realizar modificaciones nucleotídicas en cultivo de linfoblastos (Cole-Strauss y col. 1996), células de hepatoma (Kren y col. 1997) y melanocitos (Alexeev y Yoon 1998), e *in vivo* en diferentes modelos animales, obteniéndose eficiencias de corrección que van desde  $1 \times 10^{-5}$  a  $3 \times 10^{-1}$  (Kren y col. 1998; Lai y Lien 1999; Bartlett y col. 2000; Rando y col. 2000; Tagalakis y col. 2001). Sin embargo, una serie de trabajos recientes han reportado una falla persistente en los intentos de corregir mutaciones puntuales o de reproducir datos preexistentes, usando este tipo de molécula correctora (Albuquerque-Silva y col. 2001; Graham y col. 2001; Van Der y col. 2001; Yoon y col. 2002; Manzano y col. 2003), lo que ha generado una gran controversia sobre la real capacidad correctora de este tipo de molécula (Taubes 2002).

Algunos estudios han postulado que la cadena de DNA del híbrido de RNA/DNA sería la responsable de la inducción de la corrección génica (Gamper y col. 2000; Gamper, Jr. y col. 2000), lo que llevó a la generación de otro tipo de molécula correctora formada por oligonucleótidos de cadena simple de 25-100 bases de largo. Estos oligonucleótidos correctores son completamente homólogos a la secuencia blanco, excepto por la base que se desea cambiar y están protegidos en sus extremos con grupos fosforotioatos para aumentar su resistencia al ataque de nucleasas. Con el uso de este tipo de molécula se han reportado correcciones tanto en células en cultivo como en modelos *in vivo*, con una efectividad que va de  $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-3}$ , dependiendo del largo, polaridad y concentración del oligonucleótido usado (Yamamoto y col. 1992; Igoucheva y col. 2001; Kenner y col. 2002; Lu y col. 2003; Pierce y col. 2003), situándose la mayoría de los estudios en la parte inferior de este rango. Si bien este tipo de molécula correctora es más económica y simple de

sintetizar que las moléculas quiméricas de RNA/DNA, la baja eficiencia de corrección lograda continúa siendo un problema importante que impide potenciar su uso.

Otro de los sistemas de corrección utilizados se basa en el uso de vectores virales adenoasociados (AAV); debido a que el genoma de este virus está formado por una molécula de DNA de cadena simple, este puede ser utilizado como molécula correctora de manera análoga a los oligonucleótidos de DNA (Inoue y col. 1999; Inoue y col. 2001; Hirata y col. 2002). Esta metodología ha sido utilizada con éxito no solo para corregir sustituciones puntuales sino también para introducir pequeñas deleciones e inserciones (Inoue y col. 2001), sin que se detecten mutaciones secundarias o algún tipo de rearrreglo cromosómico en las células transducidas; indicando, que en células de mamíferos, la corrección génica mediada por AAV es un proceso de alta fidelidad (Russell y Hirata 1998; Inoue y col. 1999). La frecuencia de corrección génica obtenida por este método viral va de  $1 \times 10^{-3}$  a  $1 \times 10^{-2}$ . Se ha postulado que esta mayor tasa de corrección, comparada con la obtenida al utilizar oligonucleótidos de cadena simple puede deberse a una mayor eficiencia en la entrega del genoma viral al núcleo, al aumento de la homología entre la secuencia correctora y el DNA blanco o a la estructura de los terminales repetidos invertidos (ITRs) del AAV, los que se pliegan formando una estructura con forma de T que estabiliza el genoma viral y lo protege del ataque de las nucleasas.

La principal desventaja de este método viral es que para tener un nivel de corrección génica detectable se requiere del uso de una dosis de AAV muy elevada ( $5 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$  partículas virales por célula), debido a que en un AAV sintético la secuencia de DNA correctora situada entre los ITRs virales no es capaz de replicarse en el interior celular, lo que dificulta mucho el uso de este sistema de corrección

cuando se requiere tratar una gran cantidad de células y para modelos animales *in vivo*.

Los AAV poseen un genoma de 4,7 kb (Srivastava y col. 1983) formado por dos marcos abiertos de lectura que codifican las proteínas regulatorias (Rep) necesarias para la replicación viral y las proteínas estructurales (Cap) que forman la cápside del virus, flanqueados por dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de 145 bases. Se ha reportado que estos ITRs son la única secuencia en *cis* necesaria para la replicación y encapsidación de los genomas virales de cadena simple (Hauswirth y Berns 1977; Hauswirth y Berns 1979). El AAV pertenece a la familia de los dependovirus y por lo tanto necesita de la presencia de un virus ayudante, como es el adenovirus, para poder replicarse. Estudios secuenciales han permitido identificar a 5 genes adenovirales que colaboran activamente en el proceso de replicación del AAV; estos son el gen E1A, E1B, E2A, E4 y VA (Berns 1990; Muzyczka 1992).

También es importante destacar que se ha reportado que cualquier secuencia de DNA que se encuentre flanqueada por los ITRs virales del AAV en un plasmidio puede ser amplificada en la forma de DNA de cadena simple si se le suministra a la célula el gen *rep* y los genes adenovirales ayudantes previamente descritos, sin que se produzca la amplificación de la secuencia del cuerpo del plasmidio situada por afuera de los ITRs virales (Samulski y col.1982; Laughlin y col. 1983).

En el presente capítulo desarrollamos un nuevo sistema de corrección génica que evita el uso de partículas virales, basado en un plasmidio que posee una secuencia correctora de DNA carente de promotor, flanqueada por las repeticiones terminales invertidas (ITRs) del AAV. Con este nuevo sistema corrector, y usando como blanco de corrección un gen que codifica para la proteína fluorescente verde

mutada (eGFP-M) presente en forma episomal o integrado establemente en el genoma celular, hemos logrado obtener una elevada eficiencia de corrección en células asincronizadas cotransfectadas con (a) un plasmidio que contiene la secuencia correctora flanqueada por los ITRs virales más (b) un plasmidio que codifica para la proteína Rep del AAV y (c) un plasmidio portador de los genes adenovirales ayudantes necesarios para el proceso de replicación del genoma viral. Debido a que el gen que codifica para las proteínas de la cápside fue eliminado del sistema de corrección no se producen proteínas de la cápside ni se forman partículas virales en el interior celular. En este trabajo también analizamos el efecto de la detención del ciclo celular en diferentes fases en la eficiencia de corrección génica, como así también el posible mecanismo de corrección involucrado en el proceso.

## RESULTADOS

### **5.A) Incorporación de la mutación inactivante G202C en el gen *eGFP* por mutagénesis sitio dirigida.**

Se introdujo la mutación G202C (G67R) en el gen *eGFP* provocando la pérdida completa de la fluorescencia de la proteína codificada, la que es recuperada al revertirse la mutación (Pierce y col. 2003), brindando una forma práctica y precisa para determinar la eficiencia de corrección génica lograda. La mutación puntual en el gen *eGFP* se realizó por técnicas de mutagénesis sitio dirigida de la forma descrita en materiales y métodos, utilizando cuatro partidores, dos de los cuales llevan la mutación deseada en su secuencia; **Figura 5.1** (página 106).

La lipofección de células HEK-293 con el plasmidio portador del gen de la proteína fluorescente verde mutado (peGFP-M) no produjo fluorescencia detectable, confirmando que la mutación G202C produce la completa pérdida de la fluorescencia de la proteína codificada.

### **5.B) Corrección del gen *eGFP-M* por oligonucleótido sintéticos en células humanas.**

Para evaluar la capacidad de corrección del gen *eGFP-M* se sintetizó un oligonucleótido corrector de 49 bases con tres grupos fosforotioatos en cada extremo y la base correctora en la posición central, este oligonucleótido fue lipofectado tanto en células Caco-2 como en células HEK-293 junto con el plasmidio blanco de la corrección (peGFP-M). Se realizó también un control positivo en el que las células fueron lipofectadas con un plasmidio que porta el gen *eGFP* funcional y un control negativo en el que las células fueron lipofectadas sólo con el plasmidio peGFP-M. A

las 48 h postlipofección se observaron las células al microscopio de fluorescencia; **Figura 5.2** (página 107).

Mediante el uso de oligonucleótidos correctores sintéticos se logró corregir la mutación puntual en *eGFP-M* tanto en células HEK-293 como en células Caco-2; sin embargo, el porcentaje de corrección alcanzado fue muy bajo (0,001 % a 0,003 %) limitando enormemente la utilidad de este sistema. Esta baja eficiencia de corrección lograda con el uso de oligonucleótidos sintéticos avala el desarrollo de un sistema de corrección génica más eficiente.

### **5C) Desarrollo de un sistema de corrección génica mediado por elementos virales**

En forma análoga a los oligonucleótidos correctores, el genoma del virus adenoasociado (AAV) es una molécula de DNA lineal de cadena simple, por lo que podría ser utilizado como molécula correctora para modificar, de forma específica, la secuencia de un gen blanco.

Para el desarrollo de este nuevo sistema de corrección génica se construyó (a) un plasmidio corrector que posee una secuencia de 166, 365 o 609 pb del gen *eGFP* silvestre flanqueado por las secuencias terminales repetidas invertidas (ITRs) del AAV (pCorrector166, pCorrector365 y pCorrector609 respectivamente). Estos plasmidios carecen de promotor y de señal de poliadenilación, evitando que la secuencia correctora se exprese; (b) un plasmidio que codifica para la polimerasa viral Rep del AAV (pAAV-Rep); esta proteína colabora en el proceso de amplificación de la secuencia contenida entre los ITRs virales, en la forma de DNA de cadena simple. Este plasmidio carece del gen que codifica para las proteínas de la cápside viral, lo que evita la producción de partículas virales en el interior celular y (c) un plasmidio que

codifica para factores de transcripción adenovirales (genes ayudantes) necesarios para el proceso de amplificación del DNA corrector de cadena simple (pAAV-Helper); **Figura 5.3** (página 108).

Es de esperar que este nuevo sistema de corrección posea algunas ventajas importantes con respecto a otros sistemas como son (i) la producción continuada de moléculas correctoras en el interior de la célula blanco, producto de la acción amplificadora de la proteína Rep (ii) gran estabilidad y disponibilidad de las moléculas correctoras debido a la ausencia de proteínas de la cápside que evitan su encapsidación y (iii) menor costo que el necesario para la síntesis de oligonucleótidos correctores largos.

#### **5.D) Componentes necesarios para la corrección génica mediada por elementos virales.**

Con el fin de evaluar la importancia de los distintos elementos virales del sistema de corrección génica descrito anteriormente se lipofectaron células HEK-293 con el plasmidio peGFP-M (portador del gen blanco de la corrección). A las 24 h postlipofección las células fueron cotransfectadas con (a) el plasmidio que lleva la secuencia correctora de 365 pb del gen *eGFP* silvestre (pCorrector365) sólo o en combinación con (b) el plasmidio pAAV-Rep (codifica para la proteína Rep del AAV) y/o (c) el plasmidio pAAV-Helper (contiene los genes ayudantes del adenovirus). Para poder comparar la eficiencia obtenida con este nuevo sistema de corrección también se realizaron cotransfecciones en donde el plasmidio peGFP-M fue acompañado de (d) el oligonucleótido corrector sintético de 49 bases; **Figura 5.4** (página 109).

La eficiencia de corrección obtenida en las células transducidas con el sistema corrector completo (plasmidios a + b + c) fue 20 veces mayor que la alcanzada en

células transfectadas solamente con el plasmidio pCorrector365 o con el oligonucleótido corrector sintético de 49 bases dirigido hacia la misma región del DNA, aún cuando la concentración molar del oligonucleótido corrector utilizado fue 450 veces mayor a la del plasmidio pCorrector 365.

#### **5.E) Efecto del tiempo transcurrido en la eficiencia de corrección génica.**

Se analizó el efecto del tiempo transcurrido (12-120 h) entre la transfección de las células con las moléculas correctoras y la determinación de la fluorescencia; **Figura 5.5** (página 110). En el sistema corrector basado en elementos virales se observó un aumento significativo en la eficiencia de corrección al aumentar el tiempo transcurrido entre la transfección y la medición de la fluorescencia, alcanzando un máximo a las 92 h postransfección, mientras que la eficiencia de corrección mediada por el oligonucleótido sintético aumentó entre las 24 y 48 h postransfección y luego se mantuvo constante.

#### **5.F) Efecto de la región de homología en la eficiencia de corrección génica.**

Se ha reportado que para poder observar una célula fluorescente en un microscopio de fluorescencia se requieren varias copias del gen *eGFP* en el interior celular (Schindelhauer y Laner 2002), por lo que para obtener una determinación más precisa de la eficiencia de corrección cambiamos el método de detección por microscopía de fluorescencia a detección de células fluorescentes por citometría de flujo.

En estos experimentos se evaluó si el cambio en el largo de la región de homología entre la molécula correctora y el DNA blanco modifica la eficiencia de corrección. Para ello se generaron dos plasmidios correctores adicionales conteniendo

una secuencia de 166 o 609 pb del gen *eGFP* silvestre flanqueadas por los ITRs virales (pCorrector166 y pCorrector609 respectivamente). La transfección de células HEK-293 con cualquiera de los plásmidos correctores no produjo fluorescencia detectable, indicando que la secuencia correctora no origina ningún producto fluorescente.

El aumento de la homología entre la molécula correctora y su DNA blanco produjo un aumento de la eficiencia de corrección, tanto en células que llevan el gen reportero *eGFP-M* en forma episomal como en las que lo llevan integrado en sus genomas, alcanzando eficiencias de corrección de  $1,4 \times 10^{-2}$  y  $1,1 \times 10^{-2}$  respectivamente; **Figura 5.6** (página 111).

#### **5.G) Efecto de la detención del ciclo celular en la eficiencia de corrección génica.**

Para determinar si las distintas fases del ciclo celular afectan la eficiencia de corrección, células HEK-293 que llevan el gen *eGFP-M* integrado en su genoma fueron detenidas durante 24 h en las fases  $G_0$ ,  $G_1/S$  o  $G_2/M$  del ciclo celular. Se utilizaron detenciones de sólo 24 h para evitar el daño celular inducido por períodos de detención más largos. Se obtuvo un aumento de cuatro veces en la eficiencia de corrección en células detenidas en  $G_2/M$ , sugiriendo que la abundancia de algunos de los factores requeridos en el proceso de corrección génica varía a lo largo del ciclo celular; **Figura 5.7** (página 112). En estos experimentos también se observó una leve disminución en la eficiencia de corrección en las células detenidas en  $G_0$  y un leve aumento en la eficiencia de corrección en células detenidas en la fase S.

#### **5.H) Determinación de la amplificación de moléculas correctoras de cadena simple en el interior celular.**

En presencia del gen *rep* del AAV y de los genes adenovirales ayudantes, el segmento de DNA doble cadena, que lleva la secuencia correctora flanqueada por los ITRs virales debería ser amplificado en la forma de moléculas de DNA de cadena simple con un ITR en cada extremo (Samulski y col. 1982; Laughlin y col. 1983), generando un efecto corrector muy pronunciado. Para determinar si la secuencia correctora es amplificada en el interior celular, células HEK-293 fueron transfectadas con el plasmidio pCorrector609 sólo o con las distintas combinaciones de los plasmidios pAAV-Rep y pAAV-Helper. Se calculo la razón entre la secuencia correctora (presente tanto en el plasmidio pCorrector609 como en cualquier molécula de DNA de cadena simple generada a partir de el) y una secuencia del cuerpo del plasmidio (presente sólo en el plasmidio pCorrector609). Las mediciones se realizaron por PCR utilizando diferentes parejas de partidores específicas para cada una de estas secuencias; **Figura 5.8A** (página 113). Una razón de 1,0 indica que no se generaron moléculas correctoras de cadena simple a partir del plasmidio pCorrector609, mientras que una razón mayor a 1,0 indica que si se produjo amplificación.

En estos experimentos obtuvimos razones 2-3 veces mayores cuando las células fueron transfectadas con todos los componentes del sistema corrector en comparación a células transfectadas solamente con el plasmidio pCorrector609; **Figura 5.8B** (página 113), indicando una amplificación de la secuencia correctora en la forma de DNA de cadena simple en presencia del gen *rep* del AAV y de los genes ayudantes del AdV.

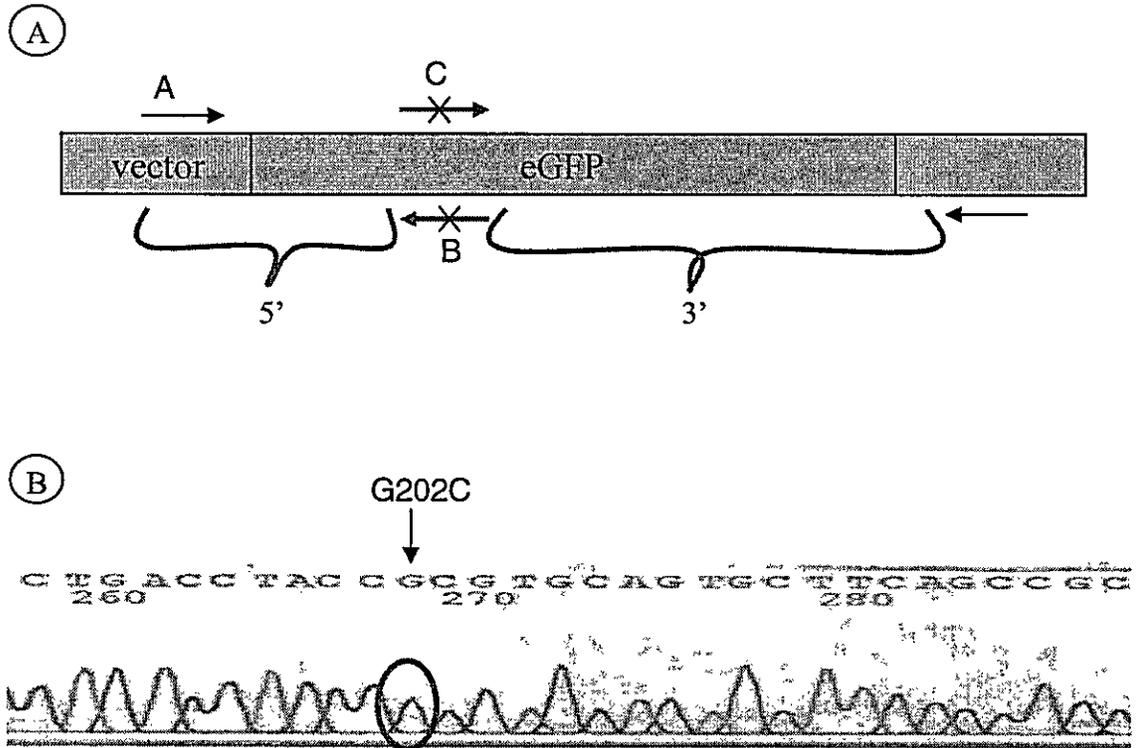
### 5.1) Determinación del mecanismo de corrección génica

Dos mecanismos de reparación, normalmente presentes en todas las células, han sido implicados en los procesos de corrección génica. Estos son (i) recombinación homóloga y (ii) corrección de pares anómalos (Buermeyer y col.1999; Kolodner y Marsischky 1999; Hirata y Russell 2000; Hirata y col. 2002). Con el fin de identificar cual de estos mecanismos de reparación está actuando en nuestro sistema de corrección génica se introdujo la mutación silente (T369A) en el gen *eGFP-M*, separada 167 bases río abajo de la mutación inactivante. La secuencia del plasmidio pCorrector609 cubre ambas mutaciones. La mutación silente produce la pérdida de un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Sfa*N I, mientras que la mutación inactivante crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Bst*U I. Comenzamos el experimento partiendo del supuesto de que ninguna de las dos mutaciones introducidas en *eGFP* sufre una corrección preferencial por el sistema corrector aquí analizado.

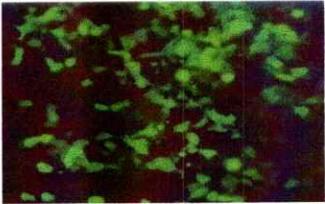
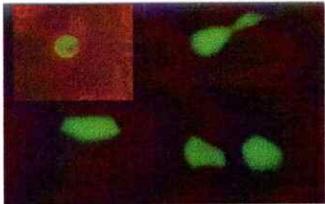
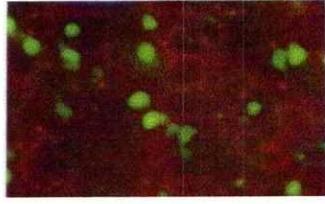
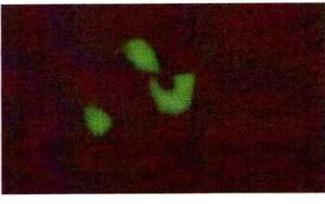
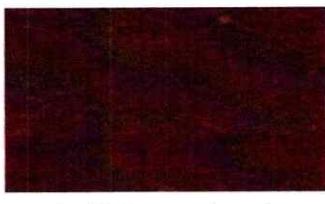
Una vez realizado el experimento de corrección, se generó un amplicón de la secuencia del gen *eGFP-M* por PCR y se sometió a digestión con la enzima de restricción *Sfa*N I (solamente las moléculas corregidas en la mutación silente son cortadas). El fragmento de DNA obtenido por la digestión con *Sfa*N I fue posteriormente purificado, amplificado y tratado con la enzima de restricción *Bst*U I. Teniendo en cuenta que sólo la secuencia portadora de la mutación inactivante puede ser cortada por *Bst*U I, los fragmentos generados por la digestión con esta enzima indican que estas moléculas no han sido corregidas. Como se muestra en la **Figura 5.9** (página 114) sólo una proporción menor (5-10 %) de los fragmentos generados por digestión con *Sfa*N I no fueron digeridos por *Bst*U I, indicando que en la mayoría de las

moléculas la mutación inactivante no ha sido corregida. Estos datos sugieren que cada mutación es corregida de forma independiente, presumiblemente mediante un mecanismo de corrección del par anómalo y no a través de un mecanismo de recombinación homóloga, el que debiera generar frecuencias de corrección idénticas para ambas mutaciones. En la **Figura 5.10** (página 115) se muestra un diagrama indicando los posibles resultados e interpretaciones empezando por la purificación del fragmento generado por digestión con *Sfa*N I (moléculas corregidas en la posición silente).

## FIGURAS

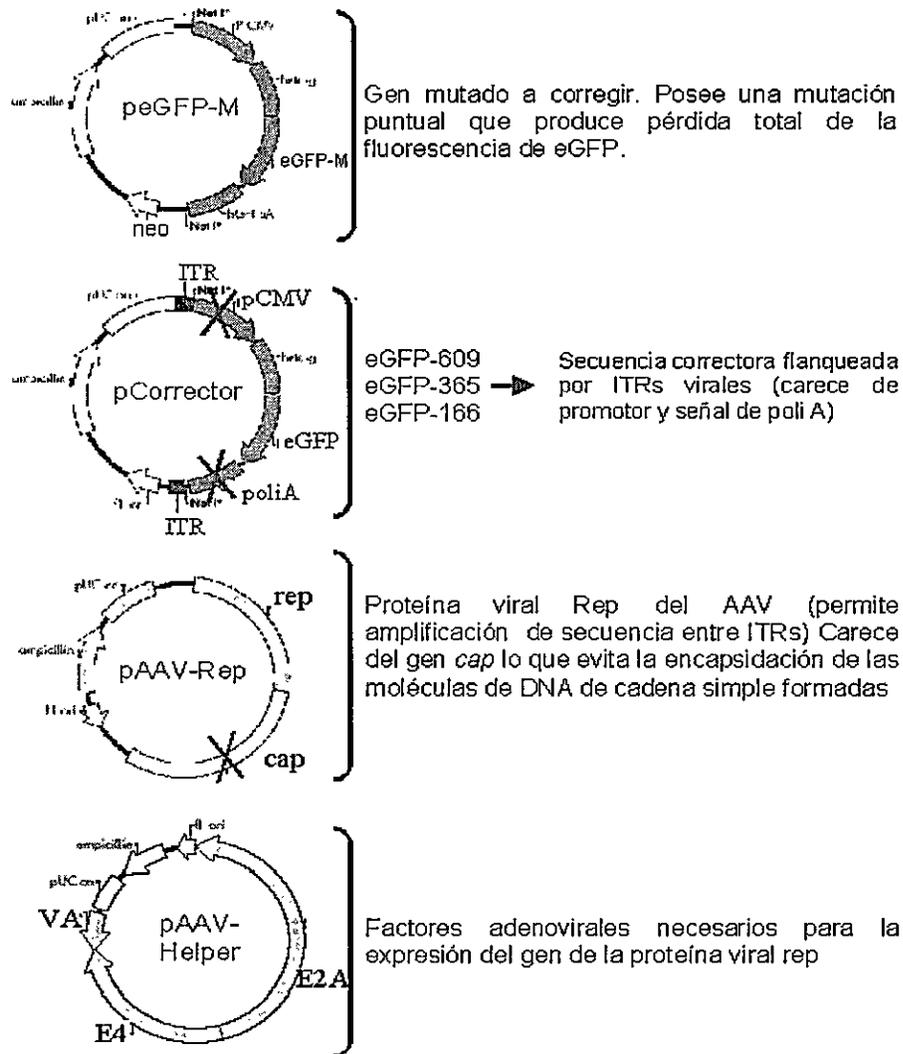


**Figura 5.1** Mutación sitio dirigida del gen *eGFP*: A) Esquema utilizado para la incorporación de la mutación G202C (G67R) en el gen *eGFP*. La mutación se introdujo por mutagénesis sitio dirigida utilizando partidores que llevan la mutación deseada en su secuencia. B) Reacción de secuenciación del gen *eGFP-M* en donde se indica el cambio nucleotídico introducido.

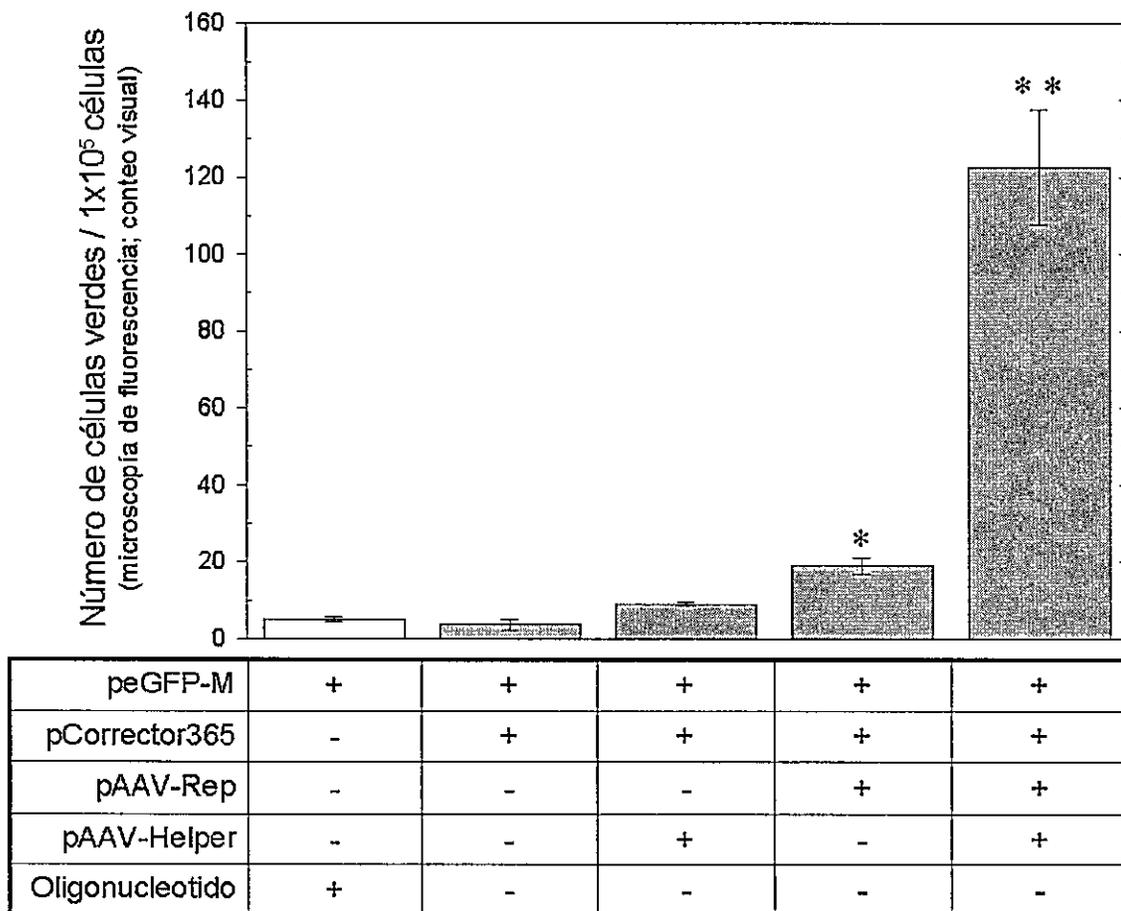
| peGFP (control +)   | peGFP-M +<br>oligonucleótido corrector  | peGFP- M (control -)  |
|---|---|---|
|  <p>430.000 células verdes de<br/>1.000.000 de células totales</p> | <p><b>HEK-293</b> 5 X</p>  <p>5 células verdes de<br/>1.000.000 de células totales</p> |  <p>0 células verdes de<br/>1.000.000 de células totales</p> |
|  <p>119.000 células verdes de<br/>700.000 de células totales</p>  | <p><b>Caco-2</b> 5 X</p>  <p>4 células verdes de<br/>700.000 de células totales</p>   |  <p>0 células verdes de<br/>700.000 de células totales</p>  |

**Porcentaje de corrección de 0,001 a 0,003 %**

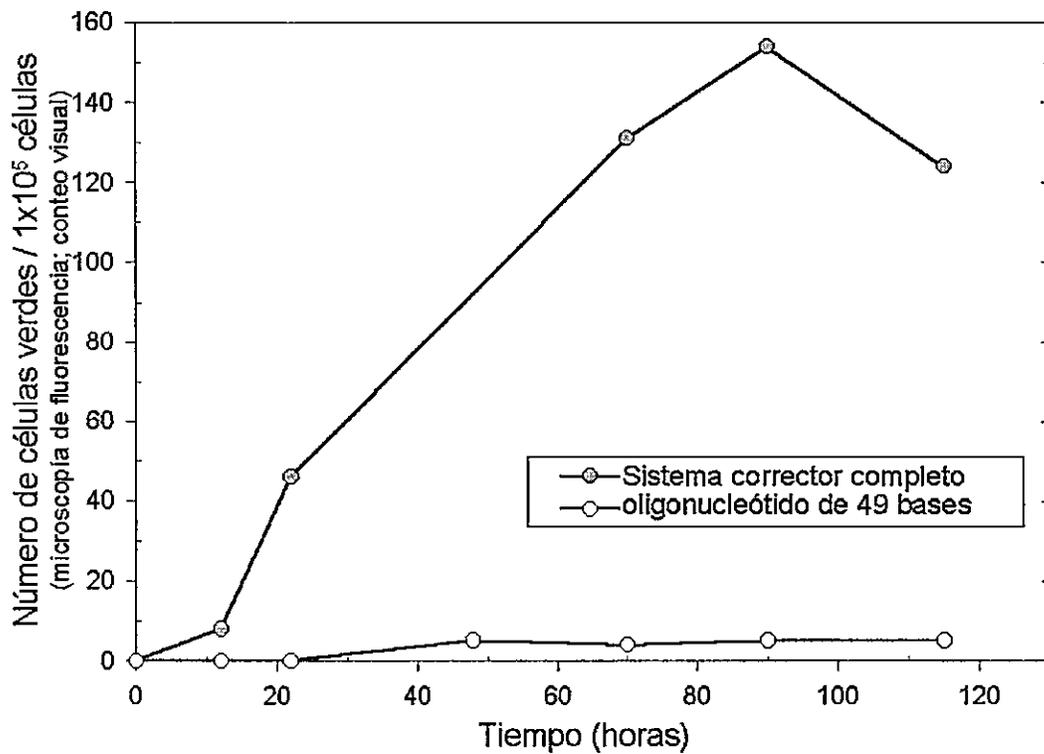
**Figura 5.2 Corrección del gen eGFP-M mediada por oligonucleótido sintético:** Células HEK-293 o Caco-2 fueron lipofectadas con el plasmidio portador del gen eGFP-M en combinación con el oligonucleótido corrector sintético. En el control positivo las células fueron lipofectadas con un plasmidio portador del gen eGFP funcional. En el control negativo las células fueron lipofectadas sólo con el plasmidio peGFP-M. 48 h postlipofección se contaron células fluorescentes en microscopio de fluorescencia. La eficiencia de corrección se calculó teniendo en cuenta el porcentaje de transfección obtenido en el control positivo.



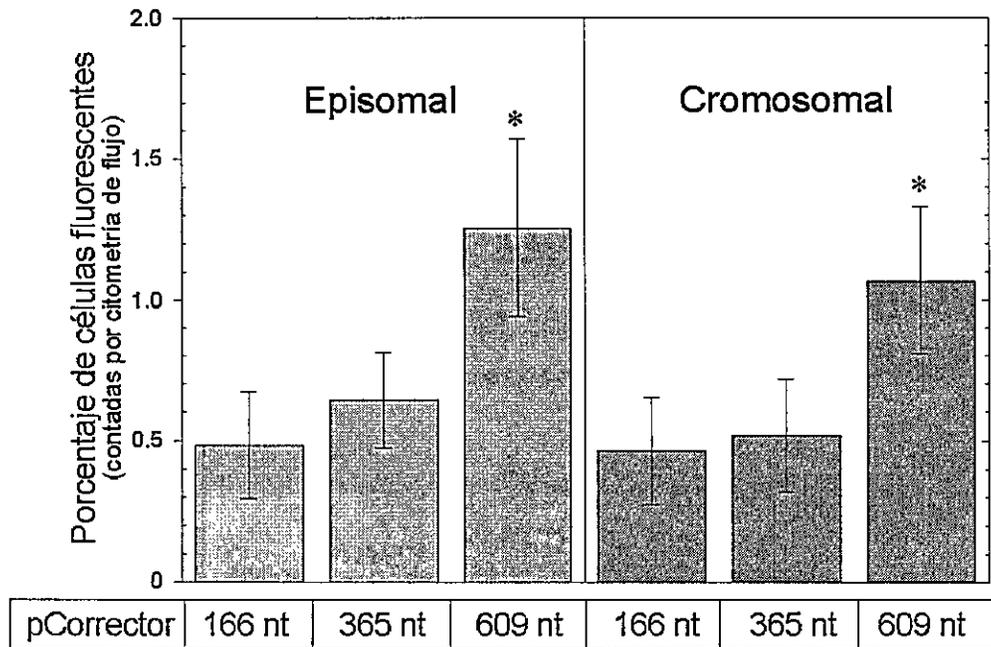
**Figura 5.3 Componentes del sistema de corrección génica mediado por elementos virales.**



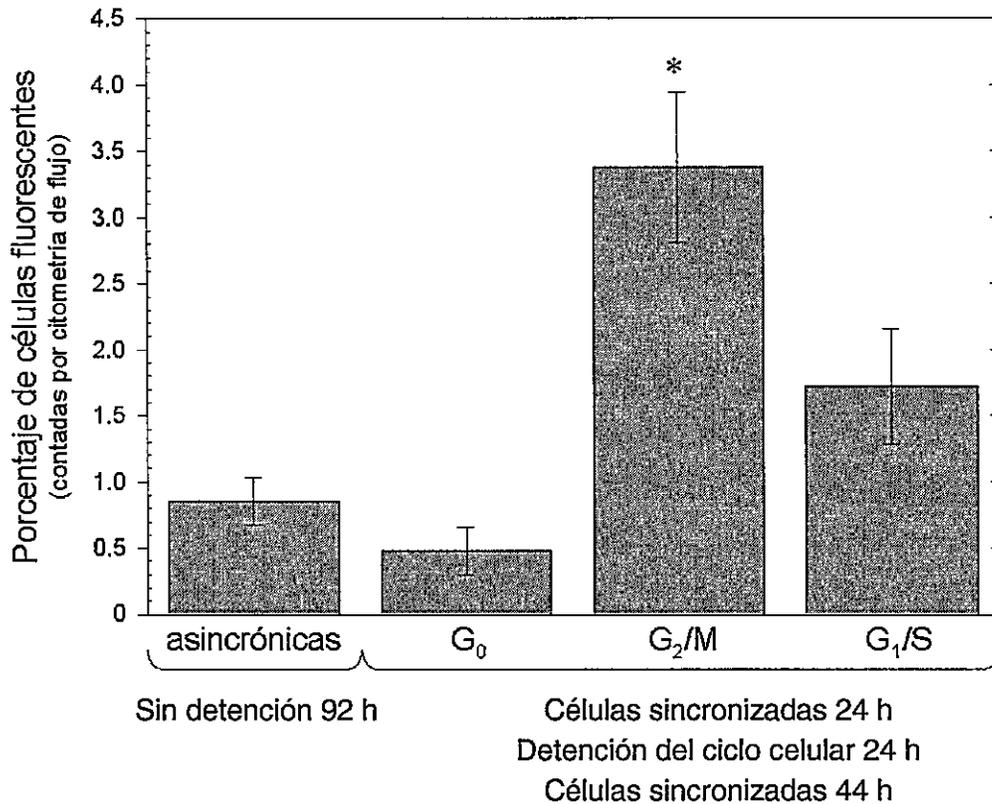
**Figura 5.4 Corrección del gen eGFP-M episomal mediada por las distintas combinaciones plasmidiales:** Células HEK-293 lipofectadas con el plasmidio peGFP-M fueron cotransfectadas 24 h después con las diferentes combinaciones plasmidiales o con un oligonucleótido corrector sintético; 92 h postransfección se contaron células verdes (corregidas) por microscopía de fluorescencia. n = 3; \* p < 0,05 \*\* p < 0,01 t-test vs. oligonucleótido corrector y vs. pCorrector 365 sólo.



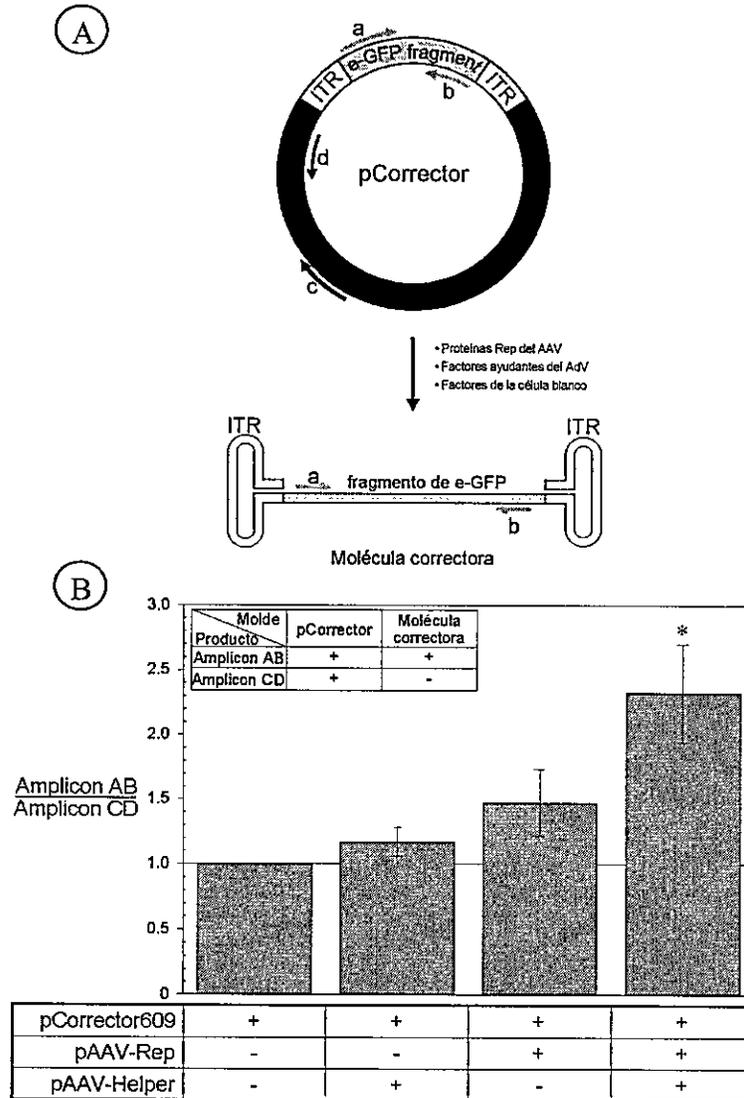
**Figura 5.5 Efecto del tiempo transcurrido en la eficiencia de corrección génica:** Se transfectaron células HEK-293 con los plasmidios pCorrector365, pAAV-Rep y pAAV-Helper o con el oligonucleótido corrector sintético. El número de células corregidas se determinó midiendo la fluorescencia a diferentes tiempos postransfección por microscopía de fluorescencia.



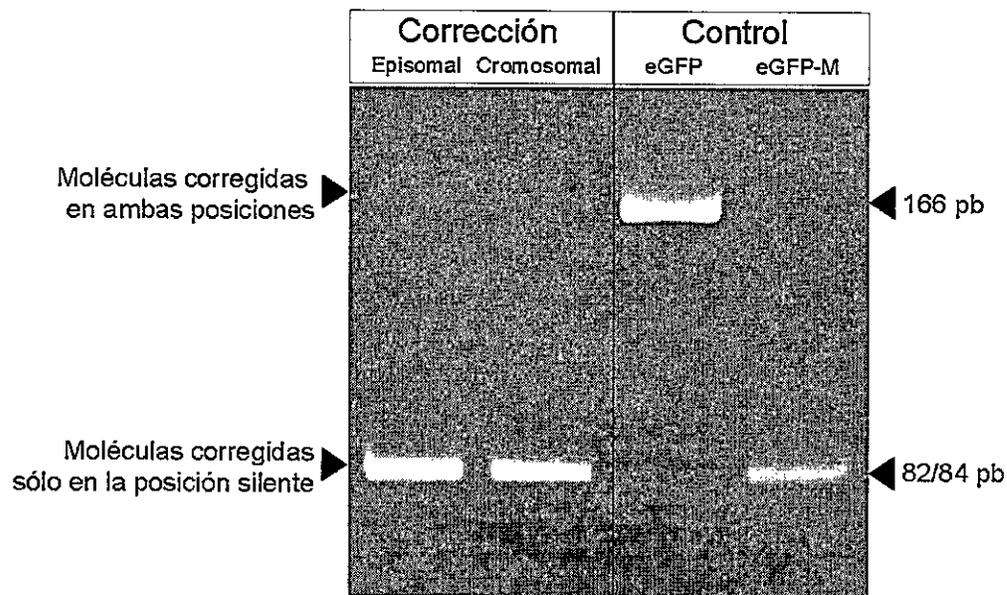
**Figura 5.6 Efecto de la extensión de la homología en la eficiencia de corrección génica.** Células HEK-293 que portan el gen blanco de la corrección eGFP-M en forma episomal o integrado en el genoma fueron cotransfectadas con el sistema corrector completo utilizando moléculas correctoras de tres largos diferentes. Se contaron células fluorescentes por citometría de flujo 92 h después de la transfección; células evaluadas 20.000;  $n = 4$ ; \*  $p < 0,05$  t-test vs. pCorrector166.



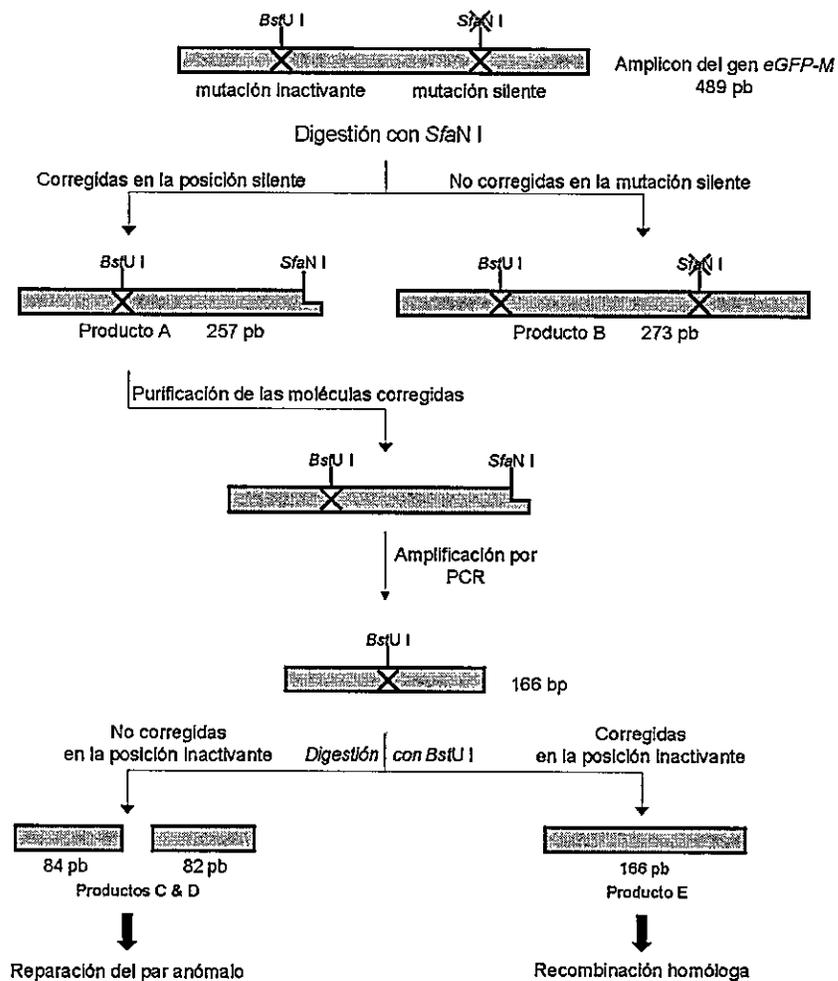
**Figura 5.7 Efecto de la detención del ciclo celular en la eficiencia de corrección génica.** Células HEK-293 que llevan el gen eGFP-M integrado en forma estable en su genoma fueron transfectadas con los plasmidios del sistema corrector completo. 24 h postransfección las células fueron detenidas en diferentes fases del ciclo celular por 24 h; posteriormente la detención celular fue liberada y se determinó la eficiencia de corrección génica por citometría de flujo a las 92 h postransfección; células evaluadas 20.000; n = 6; \* p < 0,05 t-test vs. células asincrónicas.



**Figura 5.8** Aplicación de moléculas correctoras de cadena simple en el interior celular: A) Moléculas de DNA de cadena simple son generadas a partir del plasmidio pCorrector en el interior celular. La amplificación de las moléculas correctoras puede ser detectada por PCR utilizando dos pares de partidores como se describe en materiales y métodos. Si hay producción de moléculas de DNA de cadena simple la razón del amplicón AB al amplicón CD es mayor a 1.0. B) Razón entre los amplicones obtenidos por PCR a partir de DNA aislado de células HEK-293 transfectadas con las distintas combinaciones plasmidiales;  $n = 3$ ; \* $p < 0,05$  t-test vs. pCorrector609 solo.



**Figura 5.9 Mecanismo de corrección génica:** Digestión de amplicones con la enzima de restricción *BstU I* obtenidos por PCR anidada a partir de moléculas de DNA corregidas en la mutación silente, purificadas de células que llevan el gen *eGFP-M* episomal o integrado en su genoma y que fueron transfectadas con los plasmidios del sistema corrector completo. Una digestión con *BstU I* indica que la mutación inactivante no fue corregida. Como control se realizó una PCR sobre el DNA plasmidial que lleva el gen *eGFP* o *eGFP-M* con los mismos partidores usados en la amplificación final del DNA celular (experimentos de corrección), estos amplicones generados contienen la región de la mutación inactivante pero no la de la mutación silente.



**Figura 5.10 Mecanismo de corrección génica:** Diagrama representando los pasos de amplificación por PCR y digestión realizados para discriminar entre las moléculas de DNA corregidas sólo en la mutación silente (reparación del par anómalo) de las moléculas corregidas tanto en la mutación silente como en la mutación inactivante (recombinación homóloga). Las reacciones se realizaron a partir de DNA aislado de células HEK-293 que portan el gen *eGFP-M* en forma episomal o integrado en su genoma y que fueron transfectadas con los plasmidios del sistema corrector completo.

## DISCUSIÓN

El área de la corrección génica ha generado un gran interés en la comunidad científica debido a su potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades genéticas (Richardson y col. 2002; Parekh-Olmedo y col. 2005). Con estas técnicas, la corrección de la mutación no solo se realiza de forma permanente sino que además el gen reparado queda bajo el control de su propio promotor y elementos reguladores transcripcionales. Desafortunadamente la elevada eficiencia de corrección reportada en los primeros estudios no ha podido ser reproducida. Hasta el momento con el sistema de oligonucleótidos correctores, la eficiencia de corrección alcanzada va de 0,001 a 0,1% (Igoucheva y col. 2001; Kenner y col. 2002; Lu y col. 2003; Pierce y col. 2003) y esta mediada, presumiblemente, por la reparación del par anómalo (Kenner y col. 2004); mientras que en otros modelos, usando infecciones masivas con vectores virales AAV, (10.000 a 100.000 partículas virales por célula) se han reportado eficiencias de corrección cercanas al 1 %, pero en este caso el mecanismo de corrección propuesto ha sido el de recombinación homóloga (Hirata y Russell 2000; Hirata y col. 2002). Si bien el sistema de corrección génica mediada por AAV parece ser un sistema promisorio, requiere del uso de un gran número de partículas virales, las que además de ser difíciles de obtener incorporan a las células blanco una gran cantidad de proteínas de la cápside viral que son tóxicas *per se* y que pueden activar mecanismos de inestabilidad cromosómica.

En este trabajo desarrollamos un nuevo sistema de corrección génica que no requiere del uso de partículas virales preformadas y que es capaz de corregir

mutaciones puntuales con una eficiencia que va del 1,1 al 4 %, presumiblemente a través de un mecanismo de corrección del par anómalo. La eficiencia de corrección génica lograda utilizando este nuevo sistema corrector superó ampliamente a la obtenida con el uso de oligonucleótidos correctores de cadena simple protegidos con grupos fosforotioatos en cada extremo y dirigidos hacia la misma secuencia blanco, a pesar de que el número de moléculas de oligonucleótido sintéticos necesario para obtener una corrección detectable excedió en 450 veces a la cantidad de moléculas de plasmidio pCorrector utilizada.

En estos experimentos observamos que para lograr la máxima eficiencia de corrección se requiere tanto del gen *rep* del AAV como de los genes adenovirales ayudantes, probablemente debido a que todos estos genes colaboran en el proceso de producción de moléculas de DNA de cadena simple (Berns 1990); sin embargo, también se observó corrección génica en presencia sólo del gen *rep*. Se ha postulado que este gen puede expresarse a niveles basales aún en ausencia de los genes adenovirales ayudantes, apoyando la idea de que la producción de DNA de cadena simple es un requerimiento clave en el proceso de corrección génica, en donde los factores adenovirales ayudantes actuarían incrementando la tasa de transcripción del gen *rep* (Berns 1990; Ni y col.1998); sin embargo, no es posible descartar que los genes ayudantes intervengan en algún otro evento, que en presencia de la proteína Rep, favorezca el proceso de corrección génica. Es importante destacar que todos los elementos del sistema corrector (pCorrector, pAAV-Rep y pAAV-Helper) podrían ser ensamblados en un solo vector adenoviral, lo que permitiría una mejor entrega de las moléculas correctoras a células de mamífero.

El aumento de la extensión de la región de homología entre la secuencia correctora y la molécula blanco produjo un aumento en la eficiencia de corrección, tanto para genes presentes en forma episomal como para genes integrados en el genoma celular. Este aumento en el largo de la región de homología (hasta 609 bases en el presente estudio) puede ser fácilmente generado por técnicas de biología molecular, sin embargo no es posible obtener cantidades apreciables de oligonucleótido correctores largos (más de 50 nt) con los métodos de síntesis química disponibles actualmente.

Es posible obtener datos mecanísticos que permitan una mayor comprensión del funcionamiento de este sistema de corrección, estableciendo cual es la fase del ciclo celular en donde las correcciones génicas se realizan de forma más eficiente. En este trabajo observamos que la fase  $G_2/M$  del ciclo celular proporciona la mejor combinación de los factores celulares requeridos para el proceso de corrección génica. Estos datos sugieren que es posible obtener un mayor porcentaje de corrección sometiendo a los cultivos celulares a repetidos periodos de detención del ciclo celular en  $G_2/M$ , ya que en este estudio obtuvimos frecuencias de corrección de hasta 4 % cuando las células fueron detenidas sólo el 25 % del tiempo en la fase  $G_2/M$ . Esta estrategia de detenciones sucesivas podría ser utilizada para la obtención de modelos celulares de enfermedades genéticas o para la corrección de modelos celulares preexistentes.

En un estudio reciente de gran importancia Urnov y colaboradores (2005) reportaron un nuevo sistema de corrección génica basado en el proceso de recombinación homóloga; este sistema corrector requiere de la síntesis de dos péptidos de al menos 28 aminoácidos, cada uno capaz de formar 4 dedos de zinc que

reconocen 12 bases tanto en la cadena codificante como en la cadena no codificante del gen blanco de la corrección. Estos péptidos están unidos en uno de sus extremos al dominio catalítico de la enzima de restricción *Fok I*, el que es capaz de cortar el DNA en la vecindad del sitio reconocido por los dedos de zinc. De esta forma, la actividad catalítica *Fok I* de los péptidos quiméricos, guiados por la secuencia nucleotídica, generan cortes en la doble cadena de DNA que facilitan la recombinación homóloga con una secuencia de DNA doble cadena correctora proporcionada en un plasmidio donador. El porcentaje de corrección génica logrado con este método fue de 2,2% en células asincronizadas; esto es sólo el doble de la eficiencia de corrección lograda por nuestro sistema corrector (2,2% vs. 1,1%). Sin embargo, una clara ventaja de nuestro sistema de corrección es que i) no requiere de la síntesis de dos péptidos quiméricos largos, que deben ser diseñados especialmente para cada gen que se desea corregir y ii) no tiene el riesgo de que algunos de los cortes introducidos por los péptidos quiméricos no sean religados, lo que podría traducirse en un daño cromosómico importante.

En nuestro sistema, el mecanismo de corrección génica parece ser el de corrección del par anómalo, ya que las dos mutaciones introducidas en el gen *eGFP* fueron corregidas simultáneamente en menos del 10% de los casos, descartando un mecanismo de corrección mediado por recombinación homóloga como el propuesto para el uso del AAV completo (Hirata y Russell 2000) y para el sistema basado en péptidos quiméricos formadores de dedos de zinc (Urnov y col. 2005).

El sistema de corrección génica desarrollado en el presente trabajo podría ser utilizado clínicamente en el tratamiento de enfermedades en las que la recuperación de sólo una pequeña proporción del producto génico es suficiente para revertir los

síntomas de la enfermedad, como es el caso de la hemofilia o fibrosis quística como así también en el tratamiento de enfermedades en el que una terapia de amplificación *ex vivo* es posible.

# RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES

## PRIMERA PARTE

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados en el presente trabajo, y que han sido discutidos anteriormente, nos han permitido aportar nuevos datos sobre los mecanismos celulares involucrados en la regulación de la absorción intestinal de hierro y en base a estos plantear distintos blancos terapéuticos para el tratamiento de la hemocromatosis hereditaria.

En la tabla I se presenta un resumen de los resultados más relevantes de nuestros estudios sobre la regulación de la absorción intestinal de hierro y el efecto de la inhibición de los transportadores de hierro DMT-1 y ferroportina en el modelo de células intestinales Caco-2. Seguidamente se presenta la conclusión general basada en tales estudios.

**Tabla I: Resumen de los resultados más relevantes: primera parte.**

- Las células Caco-2 responden a una sobrecarga de hierro de forma diferente dependiendo de si estas son cultivadas en insertos bicamerales o en placas de poliestireno, siendo las primeras un mejor modelo fisiológico de las células intestinales polarizadas *in vivo*.
- En células cultivadas en insertos bicamerales (polarizadas), la preincubación con altas concentraciones de hierro (50  $\mu$ M) produjo una rápida reducción en la incorporación apical del metal. Este efecto no se observó en células cultivadas en placas, sugiriendo que el grado de diferenciación alcanzado por estas no es

suficiente para lograr un sistema de regulación de la absorción de hierro completamente funcional.

- La inhibición en la incorporación apical de hierro observada en células cultivadas en insertos bicamerales se correlacionó de forma directa con una reducción en los niveles de mRNA tanto del transportador DMT-1 como del transportador ferroportina, sugiriendo que la expresión de ambos transportadores es regulada de forma coordinada dependiendo de la concentración interna del metal.
- Al transducir células Caco-2 con un vector viral AAV portador de un gen antisentido contra el mRNA del transportador DMT-1 se logró una inhibición del 55% en la incorporación apical de hierro. Esta inhibición se mantuvo constante al utilizar concentraciones crecientes de partículas virales, sugiriendo que la absorción residual de hierro observada podría deberse a algún otro mecanismo de incorporación del metal presente en células Caco-2.
- El mecanismo molecular de la inhibición se caracterizó cuantificando el nivel de expresión de DMT-1 y de su antisentido. A bajas dosis de infección el antisentido funciona a través de un mecanismo tipo RNAi, mientras que a altas dosis actúa principalmente por ocupación (y bloqueo de la traducción) del mRNA blanco. En ambos casos el mecanismo regulador encargado de aumentar la incorporación de hierro fue claramente anulado, favoreciendo el uso de estos vectores virales en una posible terapia génica para la hemocromatosis hereditaria.
- No se observaron diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de ferroportina y del receptor de transferrina I en células transducidas con

distintas dosis de AAV-DMT1 antisentido (células con niveles de incorporación de hierro reducido) en relación al nivel de expresión de estos genes en células control, sugiriendo que a pesar de que DMT-1 se encuentra inhibido, en estos estudios a largo plazo (12 días) la concentración interna de hierro habría retornado a valores normales, posiblemente mediante la entrada de hierro unido a transferrina por la ruta basolateral (esto no significa que el paso transepitelial de hierro haya retornado a valores normales).

- Se demostró la ausencia de un posible efecto tóxico asociado a la expresión del gen antisentido.
- La transducción de células Caco-2 con distintas dosis de un vector viral AAV portador de un gen antisentido contra el mRNA del transportador ferroportina produjo una inhibición del 35% en la salida basolateral de hierro, sugiriendo un efecto parcial del gen antisentido.
- No se observaron variaciones significativas en los niveles de mRNA de los transportadores DMT-1 y ferroportina en las células transducidas con las distintas dosis del vector viral AAV-ferroportina antisentido, indicando que la inhibición lograda no es suficiente para activar los mecanismos de regulación de la absorción de hierro.

### **Conclusión**

Las células Caco-2 polarizadas, cultivadas en insertos bicamerales, constituyen un buen modelo para el estudio de los mecanismos de regulación de la absorción y del transporte intestinal de hierro.

El modelo de reducción de la expresión de los transportadores de hierro DMT-1 y ferroportina, mediado por vectores AAV portadores de genes antisentido, podría ser utilizado con éxito en el desarrollo de la primera terapia génica destinada al tratamiento de la hemocromatosis hereditaria. Debido a la gran resistencia de los vectores virales AAV al pH ácido del estómago, estos podrían ser administrados por vía oral resultando en una transducción preferencial de las células del tracto gastrointestinal.

## SEGUNDA PARTE

La capacidad de corregir mutaciones puntuales que generan enfermedades ha sido considerada durante mucho tiempo como el máximo objetivo de la terapia génica. En nuestro caso, el desarrollo de un sistema de corrección génica eficiente podría ser de gran utilidad para la corrección de la mutación responsable de la hemocromatosis hereditaria, previniendo el desarrollo de esta enfermedad. Este sistema sería también muy útil para la producción de un modelo celular de hemocromatosis hereditaria por introducción de la mutación puntual Cys282Tyr en el gen *HFE* en células intestinales Caco-2 en cultivo. El desarrollo de este modelo celular permitiría estudiar, de forma aislada, cuales son los puntos de control alterados en la enfermedad y también poder probar distintas alternativas terapéuticas para su tratamiento.

En la tabla II se presenta un resumen de los resultados más relevantes sobre la producción de un nuevo sistema de modificación génica capaz de corregir o introducir mutaciones puntuales en células de mamíferos. Seguidamente se presenta la conclusión general basada en tales estudios.

**Tabla II:** Resumen de los resultados más relevantes: Segunda parte.

- Se generó un gen reportero portador de una mutación puntual, cuya proteína codificada es carente de actividad, la que es recuperada al corregirse la mutación, convirtiéndose en un sistema de evaluación de la eficiencia de corrección génica muy sensible.
- Consistente con los datos en la literatura, se corrigió la mutación introducida en el gen reportero por medio de cirugía génica mediada por oligonucleótidos sintéticos tanto en células HEK-293 como en células Caco-2, obteniéndose eficiencias de corrección de sólo 0,001 a 0,003%.
- Se desarrolló y caracterizó un nuevo sistema de corrección génica basado en el uso de elementos virales, lográndose eficiencias de corrección de 1,4% para genes episomales y de 1,1% para genes incorporados establemente en el genoma celular. Esta eficiencia de corrección excedió de 10 a 100 veces a la obtenida a partir de otros sistemas de corrección génica descritos en la literatura.
- La detención de las células durante 24 h en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular produjo un importante aumento (hasta un 4%) en la eficiencia de corrección génica. Esta estrategia de detenciones sucesivas podría ser utilizada tanto para la obtención de modelos celulares de enfermedades genéticas como el de hemocromatosis hereditaria como para la corrección de modelos celulares preexistentes.

- La combinación del gen *rep* del AAV y de los genes ayudantes del adenovirus potenciaron el efecto corrector del sistema generado, sugiriendo que estos genes están implicados en la producción de moléculas correctoras de DNA de cadena simple.
- El aumento de la región de homología entre la molécula correctora y el DNA blanco produjo un aumento en la eficiencia de corrección génica.
- Se identificó al sistema de reparación del par anómalo como el mecanismo responsable de la corrección génica.

### **Conclusión**

Se propone que el sistema de corrección génica desarrollado en el presente trabajo podría ser utilizado clínicamente en el tratamiento de enfermedades en el que una recuperación de sólo una pequeña cantidad del producto génico es suficiente para revertir el fenotipo de la enfermedad, como el caso de la hemofilia o la fibrosis quística, como así también en el tratamiento de algunos tipos de enfermedades como la inmunodeficiencia severa, en el que una terapia de amplificación *ex vivo* es factible.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abboud S, Haile DJ (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 275:19906-19912
- About-Fadi T (2005) Antisense oligonucleotides: the state of the art. *Curr Med Chem* 12:2193-2214
- Adams PC, Kertesz AE, Valberg LS (1991) Clinical presentation of hemochromatosis: a changing scene. *Am J Med* 90:445-449
- Aguirre P, Mena N, Tapia V, Arredondo M, Nunez MT (2005) Iron homeostasis in neuronal cells: a role for IREG1. *BMC Neurosci* 6:3
- Ahmad KA, Ahmann JR, Migas MC, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, Sly WS, Fleming RE (2002) Decreased liver hepcidin expression in the Hfe knockout mouse. *Blood Cells Mol Dis* 29:361-366
- Albuquerque-Silva J, Vassart G, Lavinha J, Abramowicz MJ (2001) Chimeraplasty validation. *Nat Biotechnol* 19:1011
- Alexeev V, Yoon K (1998) Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA-DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* 16:1343-1346
- Anderson WF (1992) Human gene therapy. *Science* 256:808-813
- Andrews NC, Levy JE (1998) Iron is hot: an update on the pathophysiology of hemochromatosis. *Blood* 92:1845-1851
- Andrews NC (1999) Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 341:1986-1995
- Andrews NC (2005) Molecular control of iron metabolism. *Best Pract Res Clin Haematol* 18:159-169
- Arredondo M, Munoz P, Mura CV, Nunez MT (2001) HFE inhibits apical iron uptake by intestinal epithelial (Caco-2) cells. *FASEB J* 15:1276-1278
- Arredondo M, Munoz P, Mura CV, Nunez MT (2003) DMT1, a physiologically relevant apical Cu<sup>1+</sup> transporter of intestinal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1525-C1530
- Auricchio A, Hildinger M, O'Connor E, Gao GP, Wilson JM (2001) Isolation of highly infectious and pure adeno-associated virus type 2 vectors with a single-step gravity-flow column. *Hum Gene Ther* 12:71-76
- Bacon BR, Powell LW, Adams PC, Kresina TF, Hoofnagle JH (1999) Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology* 116:193-207
- Bahram S, Gilfillan S, Kuhn LC, Moret R, Schulze JB, Lebeau A, Schumann K (1999) Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13312-13317

Bannon DI, Abounader R, Lees PS, Bressler JP (2003) Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C44-C50

Bartlett RJ, Stockinger S, Denis MM, Bartlett WT, Inverardi L, Le TT, thi MN, Morris GE, Bogan DJ, Metcalf-Bogan J, Kornegay JN (2000) In vivo targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* 18:615-622

Bastin JM, Jones M, O'Callaghan CA, Schimanski L, Mason DY, Townsend AR (1998) Kupffer cell staining by an HFE-specific monoclonal antibody: implications for hereditary haemochromatosis. *Br J Haematol* 103:931-941

Beinert H, Holm RH, Munck E (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277:653-659

Bennett CF (2002) Efficiency of antisense oligonucleotide drug discovery. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12:215-224

Berns KI (1990) Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 54:316-329

Beutler E, Gelbart T, West C, Lee P, Adams M, Blackstone R, Pockros P, Kosty M, Venditti CP, Phatak PD, Seese NK, Chorney KA, Ten Elshof AE, Gerhard GS, Chorney M (1996) Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 22:187-194

Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T (2002) Penetrance of 845G--> A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 359:211-218

Bomford A (2002) Genetics of haemochromatosis. *Lancet* 360:1673-1681

Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34:263-264

Brittenham GM, Weiss G, Brissot P, Laine F, Guillygomarc'h A, Guyader D, Moirand R, Deugnier Y (2000) Clinical Consequences of New Insights in the Pathophysiology of Disorders of Iron and Heme Metabolism. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 39-50

Buermeyer AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskay RM (1999) Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* 33:533-564

Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, Majorano N, Totaro A, Gasparini P (2000) The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 25:14-15

Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P (1999) Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* 93:4406-4417

Carella M, D'Ambrosio L, Totaro A, Grifa A, Valentino MA, Piperno A, Girelli D, Roetto A, Franco B, Gasparini P, Camaschella C (1997) Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Genet* 60:828-832

Carpenter CE, Mahoney AW (1992) Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr* 31:333-367

Carter PJ, Samulski RJ (2000) Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *Int J Mol Med* 6:17-27

Casey JL, Koeller DM, Ramin VC, Klausner RD, Harford JB (1989) Iron regulation of transferrin receptor mRNA levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3' untranslated region of the mRNA. *EMBO J* 8:3693-3699

Cole-Strauss A, Yoon K, Xiang Y, Byrne BC, Rice MC, Gryn J, Holloman WK, Kmiec EB (1996) Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science* 273:1386-1389

Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG, Rodning CR (1992) Newly identified iron-binding protein in human duodenal mucosa. *Blood* 79:244-247

Conrad ME, Umbreit JN (1993) A concise review: iron absorption--the mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption. *Am J Hematol* 42:67-73

Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG (1993b) Rat duodenal iron-binding protein mobilferrin is a homologue of calreticulin. *Gastroenterology* 104:1700-1704

Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG, Hainsworth LN, Porubcin M, Simovich MJ, Nakada MT, Dolan K, Garrick MD (2000a) Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G767-G774

Conrad ME, Umbreit JN (2000b) Iron absorption and transport-an update. *Am J Hematol* 64:287-298

Coppolino MG, Woodside MJ, Demarex N, Grinstein S, St Arnaud R, Dedhar S (1997) Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* 386:843-847

De D, I, Ward DM, Nemeth E, Vaughn MB, Musci G, Ganz T, Kaplan J (2005) The molecular basis of ferroportin-linked hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8955-8960

Deiss A (1983) Iron metabolism in reticuloendothelial cells. *Semin Hematol* 20:81-90

Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403:776-781

Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC (2005) The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab* 1:191-200

During MJ, Xu R, Young D, Kaplitt MG, Sherwin RS, Leone P (1998) Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat Med* 4:1131-1135

Edwards CQ, Griffen LM, Goldgar D, Drummond C, Skolnick MH, Kushner JP (1988) Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors. *N Engl J Med* 318:1355-1362

Eisenstein RS, Ross KL (2003) Novel roles for iron regulatory proteins in the adaptive response to iron deficiency. *J Nutr* 133:1510S-1516S

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R, Jr., Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13:399-408

Fleming MD, Trenor CC, III, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC (1997) Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 16:383-386

Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC (1998) Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1148-1153

Fleming RE, Migas MC, Zhou X, Jiang J, Britton RS, Brunt EM, Tomatsu S, Waheed A, Bacon BR, Sly WS (1999) Mechanism of increased iron absorption in murine model of hereditary hemochromatosis: increased duodenal expression of the iron transporter DMT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3143-3148

Fleming RE, Sly WS (2001) Ferroportin mutation in autosomal dominant hemochromatosis: loss of function, gain in understanding. *J Clin Invest* 108:521-522

Fletcher LM, Powell LW (2003) Hemochromatosis and alcoholic liver disease. *Alcohol* 30:131-136

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59:221-226

Follett JR, Suzuki YA, Lonnerdal B (2002) High specific activity heme-Fe and its application for studying heme-Fe metabolism in Caco-2 cell monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G1125-G1131

Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Vulpe CD, McKie AT, Trinder D, Anderson GJ (2002) Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 123:835-844

Frazer DM, Anderson GJ (2003) The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood Cells Mol Dis* 30:288-297

Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Murphy TL, Vulpe CD, McKie AT, Anderson GJ (2003b) A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. *Gut* 52:340-346

Galli A, Bergamaschi G, Recalde H, Biasiotto G, Santambrogio P, Boggi S, Levi S, Arosio P, Cazzola M (2004) Ferroportin gene silencing induces iron retention and enhances ferritin synthesis in human macrophages. *Br J Haematol* 127:598-603

Gamper HB, Jr., Cole-Strauss A, Metz R, Parekh H, Kumar R, Kmiec EB (2000a) A plausible mechanism for gene correction by chimeric oligonucleotides. *Biochemistry* 39:5808-5816

Gamper HB, Parekh H, Rice MC, Bruner M, Youkéy H, Kmiec EB (2000b) The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts. *Nucleic Acids Res* 28:4332-4339

Ganz T (2003) Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 102:783-788

Ganz T (2005a) Cellular iron: ferroportin is the only way out. *Cell Metab* 1:155-157

Ganz T (2005b) Heparin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol* 18:171-182

Garrick MD, Gniecko K, Liu Y, Cohan DS, Garrick LM (1993) Transferrin and the transferrin cycle in Belgrade rat reticulocytes. *J Biol Chem* 268:14867-14874

Gehrke SG, Kulaksiz H, Herrmann T, Riedel HD, Bents K, Veltkamp C, Stremmel W (2003) Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. *Blood* 102:371-376

Graham IR, Manzano A, Tagalakis AD, Mohri Z, Sperber G, Hill V, Beattie S, Schepelmann S, Dickson G, Owen JS (2001) Gene repair validation. *Nat Biotechnol* 19:507-508

Grimm D, Kleinschmidt JA (1999) Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use. *Hum Gene Ther* 10:2445-2450

Gruenheid S, Canonne-Hergaux F, Gauthier S, Hackam DJ, Grinstein S, Gros P (1999) The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J Exp Med* 189:831-841

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388:482-488

Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418:244-251

Harrison PM, Arosio P (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1275:161-203

Hauswirth WW, Berns KI (1977) Origin and termination of adeno-associated virus DNA replication. *Virology* 78:488-499

Hauswirth WW, Berns KI (1979) Adeno-associated virus DNA replication: nonunit-length molecules. *Virology* 93:57-68

Hayden MR, Goldberg YP (2004) Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 36:77-82

Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117:285-297

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96:736-749

Hirata RK, Russell DW (2000) Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J Virol* 74:4612-4620

Hirata R, Chamberlain J, Dong R, Russell DW (2002) Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors. *Nat Biotechnol* 20:735-738

Holmstrom P, Dzikaite V, Hultcrantz R, Melefors O, Eckes K, Stal P, Kinnman N, Smedsrod B, Gafvels M, Eggertsen G (2003) Structure and liver cell expression pattern of the HFE gene in the rat. *J Hepatol* 39:308-314

Hubert N, Hentze MW (2002) Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12345-12350

Igoucheva O, Yoon K (2000) Targeted single-base correction by RNA-DNA oligonucleotides. *Hum Gene Ther* 11:2307-2312

Igoucheva O, Alexeev V, Yoon K (2001) Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells. *Gene Ther* 8:391-399

Inoue N, Hirata RK, Russell DW (1999) High-fidelity correction of mutations at multiple chromosomal positions by adeno-associated virus vectors. *J Virol* 73:7376-7380

Inoue N, Dong R, Hirata RK, Russell DW (2001) Introduction of single base substitutions at homologous chromosomal sequences by adeno-associated virus vectors. *Mol Ther* 3:526-530

Ilyin G, Courselaud B, Troadec MB, Pigeon C, Alizadeh M, Leroyer P, Brissot P, Loreal O (2003) Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload. *FEBS Lett* 542:22-26

Johnson DM, Yamaji S, Tennant J, Srai SK, Sharp PA (2005) Regulation of divalent metal transporter expression in human intestinal epithelial cells following exposure to non-haem iron. *FEBS Lett* 579:1923-1929

Jordan M, Wurm F (2004) Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods* 33:136-143

Kenner O, Kneisel A, Klingler J, Bartelt B, Speit G, Vogel W, Kaufmann D (2002) Targeted gene correction of hprt mutations by 45 base single-stranded oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 299:787-792

Kenner O, Lutomska A, Speit G, Vogel W, Kaufmann D (2004) Concurrent targeted exchange of three bases in mammalian hprt by oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 321:1017-1023

Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M (2005) Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1324-1328

Kolodner RD, Marsischky GT (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 9:89-96

Kren BT, Cole-Strauss A, Kmiec EB, Steer CJ (1997) Targeted nucleotide exchange in the alkaline phosphatase gene of HuH-7 cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Hepatology* 25:1462-1468

Kren BT, Bandyopadhyay P, Steer CJ (1998) In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Med* 4:285-290

Lai LW, Lien YH (1999) Homologous recombination based gene therapy. *Exp Nephrol* 7:11-14

Laughlin CA, Tratschin JD, Coon H, Carter BJ (1983) Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids. *Gene* 23:65-73

Lebron JA, West AP, Jr., Bjorkman PJ (1999) The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J Mol Biol* 294:239-245

Lee PL, Gelbart T, West C, Halloran C, Beutler E (1998) The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. *Blood Cells Mol Dis* 24:199-215

Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC (1999a) Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet* 21:396-399

Levy JE, Montross LK, Cohen DE, Fleming MD, Andrews NC (1999b) The C282Y mutation causing hereditary hemochromatosis does not produce a null allele. *Blood* 94:9-11

Levy JE, Montross LK, Andrews NC (2000) Genes that modify the hemochromatosis phenotype in mice. *J Clin Invest* 105:1209-1216

Lu IL, Lin CY, Lin SB, Chen ST, Yeh LY, Yang FY, Au LC (2003) Correction/mutation of acid alpha-D-glucosidase gene by modified single-stranded oligonucleotides: in vitro and in vivo studies. *Gene Ther* 10:1910-1916

Manzano A, Mohri Z, Sperber G, Ogris M, Graham I, Dickson G, Owen JS (2003) Failure to generate atheroprotective apolipoprotein AI phenotypes using synthetic RNA/DNA oligonucleotides (chimeraplasts). *J Gene Med* 5:795-802

Martini LA, Tchack L, Wood RJ (2002) Iron treatment downregulates DMT1 and IREG1 mRNA expression in Caco-2 cells. *J Nutr* 132:693-696

McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 5:299-309

McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F, Simpson RJ (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291:1755-1759

Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause KH, Opas M, MacLennan DH, Michalak M (1999) Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol* 144:857-868

Monahan PE, Samulski RJ (2000) AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther* 7:24-30

Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, Trenor CC, Gasparini P, Andrews NC, Pietrangelo A (2001) Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest* 108:619-623

Muzyczka N (1992) Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 158:97-129

Nelson N (1999) Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J* 18:4361-4371

Nelson JE, Kowdley KV (2005) Non-HFE Hemochromatosis: Genetics, Pathogenesis, and Clinical Management. *Curr Gastroenterol Rep* 7:71-80

Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T (2004a) IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113:1271-1276

Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J (2004b) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306:2090-2093

Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T (2006) The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood* 107:328-333

Ni TH, McDonald WF, Zolotukhin I, Melendy T, Waga S, Stillman B, Muzyczka N (1998) Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection. *J Virol* 72:2777-2787

Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S (2001) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8780-8785

Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Siritto M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S (2002a) Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4596-4601

Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S (2002b) The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 110:1037-1044

Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S (2002c) Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis* 29:327-335

Nicolas G, Viatte L, Lou DQ, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Andrews NC, Vaulont S (2003) Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet* 34:97-101

Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, Stremmel W, Trampisch HJ, Strohmeyer G (1985) Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 313:1256-1262

Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, Berghuis B, van Dongen JW, Breuning MH, Snijders PJ, Rutten WP, Sandkuijl LA, Oostra BA, van Duijn CM, Heutink P (2001) A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet* 28:213-214

Nunez MT, Alvarez X, Smith M, Tapia V, Glass J (1994) Role of redox systems on Fe<sup>3+</sup> uptake by transformed human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Am J Physiol* 267:C1582-C1588

Nunez MT, Nunez-Millacura C, Tapia V, Munoz P, Mazariego D, Arredondo M, Mura C, Maccioni RB (2003) Iron-activated iron uptake: a positive feedback loop mediated by iron regulatory protein 1. *Biometals* 16:83-90

Oates PS, Trinder D, Morgan EH (2000) Gastrointestinal function, divalent metal transporter-1 expression and intestinal iron absorption. *Pflugers Arch* 440:496-502

Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilla S, Rossi E, Summerville L, Powell LW (1999) A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 341:718-724

Pantopoulos K (2004) Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci* 1012:1-13

Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dube MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J, Risler JK, Zaborowska C, Babakaiff R, Radomski CC, Pape TD, Davidas O, Christakis J, Brissot P, Lockitch G, Ganz T,

Parekh-Olmedo H, Ferrara L, Brachman E, Kmiec EB (2005) Gene therapy progress and prospects: targeted gene repair. *Gene Ther* 12:639-646

Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T (2001) Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276:7806-7810

Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Sly WS (1997) Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13198-13202

Philpott CC (2002) Molecular aspects of iron absorption: Insights into the role of HFE in hemochromatosis. *Hepatology* 35:993-1001

Pierce EA, Liu Q, Igoucheva O, Omarrudin R, Ma H, Diamond SL, Yoon K (2003) Oligonucleotide-directed single-base DNA alterations in mouse embryonic stem cells. *Gene Ther* 10:24-33

Pietrangelo A (2004) The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis* 32:131-138

Pietrangelo A (2005) Non-HFE hemochromatosis. *Semin Liver Dis* 25:450-460

Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O (2001) A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276:7811-7819

- Ponka P (1997) Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* 89:1-25
- Priwitzerova M, Nie G, Sheftel AD, Pospisilova D, Divoky V, Ponka P (2005) Functional consequences of the human DMT1 (SLC11A2) mutation on protein expression and iron uptake. *Blood* 106:3985-3987
- Rando TA, Disatnik MH, Zhou LZ (2000) Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5363-5368
- Rice MC, Czymmek K, Kmiec EB (2001) The potential of nucleic acid repair in functional genomics. *Nat Biotechnol* 19:321-326
- Richardson PD, Kren BT, Steer CJ (2002) Gene repair in the new age of gene therapy. *Hepatology* 35:512-518
- Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, Loukopoulos D, Camaschella C (2003) Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 33:21-22
- Rolfs A, Bonkovsky HL, Kohlröser JG, McNeal K, Sharma A, Berger UV, Hediger MA (2002) Intestinal expression of genes involved in iron absorption in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G598-G607
- Russell DW, Hirata RK (1998) Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet* 18:325-330
- Ryter SW, Tyrrell RM (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28:289-309
- Salter-Cid L, Brunmark A, Li Y, Leturcq D, Peterson PA, Jackson MR, Yang Y (1999) Transferrin receptor is negatively modulated by the hemochromatosis protein HFE: implications for cellular iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5434-5439
- Samulski RJ, Berns KI, Tan M, Muzyczka N (1982) Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:2077-2081
- Sazani P, Vacek MM, Kole R (2002) Short-term and long-term modulation of gene expression by antisense therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 13:468-472
- Schimanski LM, Drakesmith H, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards JP, Sweetland E, Bastin JM, Cowley D, Chinthammitr Y, Robson KJ, Townsend AR (2005) In vitro functional analysis of human ferroportin (FPN) and hemochromatosis-associated FPN mutations. *Blood* 105:4096-4102
- Schindelhauer D, Laner A (2002) Visible transient expression of EGFP requires intranuclear injection of large copy numbers. *Gene Ther* 9:727-730
- Sham RL, Phatak PD, West C, Lee P, Andrews C, Beutler E (2005) Autosomal dominant hereditary hemochromatosis associated with a novel ferroportin mutation and unique clinical features. *Blood Cells Mol Dis* 34:157-161

- Sharp P, Tandy S, Yamaji S, Tennant J, Williams M, Singh Srai SK (2002) Rapid regulation of divalent metal transporter (DMT1) protein but not mRNA expression by non-haem iron in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett* 510:71-76
- Shayeghi M, Latunde-Dada G, Oakhill J, Laftah A, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann F, Hider R, Frazer D, Anderson G, Vulpe C, Simpson R, McKie A (2005) Identification of an Intestinal Heme Transporter. *Cell* 122:789-801
- Sipe DM, Murphy RF (1991) Binding to cellular receptors results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH. *J Biol Chem* 266:8002-8007
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5:834-839
- Smith PM, Godfrey BE, Williams R (1969) Iron absorption in idiopathic haemochromatosis and its measurement using a whole-body counter. *Clin Sci* 37:519-531
- Srivastava A, Lusby EW, Berns KI (1983) Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 45:555-564
- Stuart KA, Anderson GJ, Frazer DM, Powell LW, McCullen M, Fletcher LM, Crawford DH (2003) Duodenal expression of iron transport molecules in untreated haemochromatosis subjects. *Gut* 52:953-959
- Tagalakis AD, Graham IR, Riddell DR, Dickson JG, Owen JS (2001) Gene correction of the apolipoprotein (Apo) E2 phenotype to wild-type ApoE3 by in situ chimeraplasty. *J Biol Chem* 276:13226-13230
- Tal M, Silberstein A, Nusser E (1985) Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *J Biol Chem* 260:9976-9980
- Tallkvist J, Bowlus CL, Lonnerdal B (2000) Functional and molecular responses of human intestinal Caco-2 cells to iron treatment. *Am J Clin Nutr* 72:770-775
- Tallkvist J, Bowlus CL, Lonnerdal B (2003) Effect of iron treatment on nickel absorption and gene expression of the divalent metal transporter (DMT1) by human intestinal Caco-2 cells. *Pharmacol Toxicol* 92:121-124
- Tandy S, Williams M, Leggett A, Lopez-Jimenez M, Dedes M, Ramesh B, Srai SK, Sharp P (2000) Nramp2 expression is associated with pH-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J Biol Chem* 275:1023-1029
- Taubes G (2002) Gene therapy. The strange case of chimeraplasty. *Science* 298:2116-2120
- Townsend A, Drakesmith H (2002) Role of HFE in iron metabolism, hereditary haemochromatosis, anaemia of chronic disease, and secondary iron overload. *Lancet* 359:786-790
- Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynyk JK (2002) Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut* 51:290-295

Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC (2005) Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435:646-651

Van der SG, Schuilenga-Hut PH, Buys CH, Scheffer H, Pas HH, Jonkman MF (2001) Persistent failures in gene repair. *Nat Biotechnol* 19:305-306

Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ (1999) Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 21:195-199

Waheed A, Parkkila S, Zhou XY, Tomatsu S, Tsuchihashi Z, Feder JN, Schatzman RC, Britton RS, Bacon BR, Sly WS (1997) Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12384-12389

Waheed A, Parkkila S, Saarnio J, Fleming RE, Zhou XY, Tomatsu S, Britton RS, Bacon BR, Sly WS (1999) Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1579-1584

Wallace DF, Clark RM, Harley HA, Subramaniam VN (2004) Autosomal dominant iron overload due to a novel mutation of ferroportin1 associated with parenchymal iron loading and cirrhosis. *J Hepatol* 40:710-713

Wojcik JP, Speechley MR, Kertesz AE, Chakrabarti S, Adams PC (2002) Natural history of C282Y homozygotes for hemochromatosis. *Can J Gastroenterol* 16:297-302

Worthington MT, Browne L, Battle EH, Luo RQ (2000) Functional properties of transfected human DMT1 iron transporter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G1265-G1273

Xiong S, She H, Sung CK, Tsukamoto H (2003) Iron-dependent activation of NF-kappaB in Kupffer cells: a priming mechanism for alcoholic liver disease. *Alcohol* 30:107-113

Yamamoto T, Moerschell RP, Wakem LP, Komar-Panicucci S, Sherman F (1992) Strand-specificity in the transformation of yeast with synthetic oligonucleotides. *Genetics* 131:811-819

Yeh KY, Yeh M, Watkins JA, Rodriguez-Paris J, Glass J (2000) Dietary iron induces rapid changes in rat intestinal divalent metal transporter expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G1070-G1079

Yoon K, Cole-Strauss A, Kmiec EB (1996) Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA.DNA oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2071-2076

Yoon K, Igoucheva O, Alexeev V (2002) Expectations and reality in gene repair. *Nat Biotechnol* 20:1197-1198

Zhang AS, Xiong S, Tsukamoto H, Enns CA (2004) Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes. *Blood* 103:1509-1514

Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Parkkila S, Waheed A, Jiang J, Fei Y, Brunt EM, Ruddy DA, Prass CE, Schatzman RC, O'Neill R, Britton RS, Bacon BR, Sly WS (1998) HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2492-2497

Zoller H, Pietrangelo A, Vogel W, Weiss G (1999) Duodenal metal-transporter (DMT-1, NRAMP-2) expression in patients with hereditary haemochromatosis. *Lancet* 353:2120-2123

Zoller H, Koch RO, Theurl I, Obrist P, Pietrangelo A, Montosi G, Haile DJ, Vogel W, Weiss G (2001) Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. *Gastroenterology* 120:1412-1419

Zoller H, Theurl I, Koch R, Kaser A, Weiss G (2002) Mechanisms of iron mediated regulation of the duodenal iron transporters divalent metal transporter 1 and ferroportin 1. *Blood Cells Mol Dis* 29:488-497

## ANEXO I

Trabajos publicados durante el desarrollo del presente trabajo de tesis:

- "Antisense gene delivered by an adenoassociated viral vector inhibits iron uptake in human intestinal cells: potential application in hemochromatosis.". Ezquer F, Núñez MT, Israel Y. *Biochemical Pharmacology* 69 (11): 1559-1566, 2005.
  
- "Hereditary hemochromatosis: an opportunity for gene therapy". Ezquer F, Núñez MT, Rojas A, Asenjo J, Israel Y. *Biological Research* 38 (4):71-82, 2005.
  
- "Gene repair in mammalian cells: new system mediated by viral elements". Ezquer F, Cortínez G, Sapag A, Núñez MT, Israel Y. *Gene Therapy*, submitted, Marzo 2006.

