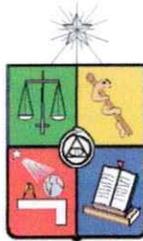


VCH-FC
Biotecnología

048

C01

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS METALOTIONEÍNAS 1 Y 2 EN EL
PROCESO DE ADAPTACIÓN A COBRE EN FIBROBLASTOS
EMBRIONARIOS DE RATÓN”**

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

FELIPE ALBERTO OLIVARES VERA

Dr. Mauricio González Canales
Director Seminario de Título

Mauricio González

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Marco Tulio Nuñez González
Presidente Comisión

Marco Tulio Nuñez González

Dr. Ricardo Cabrera Paucar
Corrector

Ricardo Cabrera Paucar

Santiago de Chile, junio de 2007



Quiero que quede por escrito:

Tengo mucho por qué agradecer.

A mis padres, Hilda y Alberto.

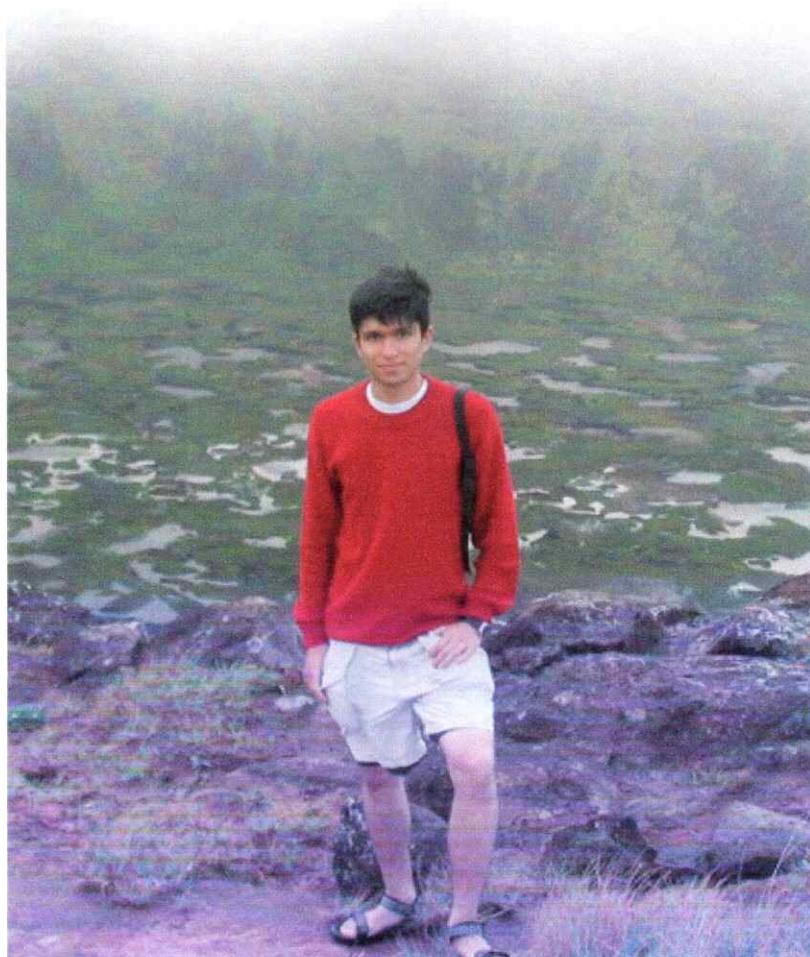
A mi hermano Ricardo.

A mi profesor tutor, Doctor González, y a "La Jefa", Doctora Cambiazo.

A mis amigos... Chodar, Leo, Jano, Pablo, Daniel, Angélica, Freddy, Juanu, Cote,

Simón, Pulga, Ailen, Tonijua, Mauro, Pata, Lucho, Miriam.

Y a Dios...



Nacido un 4 de Febrero de 1981 en la ilustre ciudad de Rancagua, hijo de la ilustre Hilda Vera y el ilustre Alberto Olivares, Felipe Olivares Vera decidió embarcarse en la carrera de científico loco. Amante de la música, los viajes y los libros, ingresó el año 1999 al programa de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile. El año 2004 inició su memoria de título en el Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica del INTA, bajo la tutela del Doctor Mauricio González, trabajo que hoy ve la luz...

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
1. El cobre como nutriente.....	1
2. El cobre como agente tóxico.....	1
3. Las metalotioneínas.....	2
4. Metalotioneína y regulación génica.....	3
5. Hipótesis.....	4
6. Objetivo General.....	4
7. Objetivos Específicos.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
1. MATERIALES.....	7
1.1. Líneas Celulares.....	7
1.2. Anticuerpos.....	7
1.3. Sales y Reactivos.....	8

2. MÉTODOS.....	8
2.1. Cultivo y tratamiento de líneas celulares.....	8
2.1.1. Mantenición de líneas celulares en cultivo.....	8
2.1.2. Conteo por tinción con azul tripán.....	9
2.1.3. Almacenamiento de líneas celulares.....	9
2.1.4. Tratamientos con cobre.....	9
2.2. Procedimientos generales.....	10
2.2.1. Cuantificación de metales.....	10
2.2.2. Cuantificación de proteínas.....	11
2.2.3. Estimación de la viabilidad celular (MTT).....	11
2.2.4. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	12
2.3. Procedimientos de biología molecular.....	13
2.3.1. Electroforesis.....	13
2.3.2. Cuantificación de DNA y RNA.....	13
2.3.3. Extracción de RNA total.....	14
2.3.4. Síntesis de cDNAs.....	15
2.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
2.3.6. Hibridación en microarreglos (<i>microarrays</i>).....	16
2.4. Análisis Bioinformático.....	17
2.4.1. Asignación de la identidad de secuencias cortas expresadas (<i>ESTs</i>).....	17
2.4.2. Clasificación funcional de genes.....	17

RESULTADOS.....	19
1. Caracterización de líneas celulares.....	19
1.1. Morfología y proliferación.....	19
1.2. Contenido de metales.....	21
2. Efecto de concentraciones suprafisiológicas de cobre sobre fibroblastos <i>mt+</i> y <i>mt-</i>	22
2.1. Viabilidad.....	23
2.2. Contenido de cobre, hierro y zinc.....	24
3. Expresión génica en fibroblastos expuestos a cobre.....	26
3.1. Extracción de RNAs y síntesis de cDNAs.....	26
3.2. Clasificación de los genes identificados por microarreglos.....	29
DISCUSIÓN.....	36
1. Características de la metodología empleada.....	36
2. Clasificación funcional de los genes identificados.....	38
3. Proliferación y viabilidad en fibroblastos <i>mt+</i> y <i>mt-</i>	39
4. Metabolismo de cobre.....	40
5. Metabolismo de hierro.....	42
6. Expresión génica, estrés oxidativo, estrés térmico y ubiquitinación.....	44
CONCLUSIONES.....	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

MATERIAL ANEXO.....	56
Tabla 1. Genes regulados positivamente en fibroblastos <i>mt+</i> tratados con 50 μ M de Cu-His.....	57
Tabla 2. Genes regulados positivamente en fibroblastos <i>mt-</i> tratados con 50 μ M de Cu-His.....	57
Tabla 3. Genes regulados positivamente en fibroblastos <i>mt+</i> y <i>mt-</i> tratados con 100 μ M de Cu-His.....	58
Tabla 4. Genes regulados positivamente solo en fibroblastos <i>mt+</i> tratados con 100 μ M de Cu-His.....	59-60
Tabla 5. Genes regulados positivamente solo en fibroblastos <i>mt-</i> tratados con 100 μ M de Cu-His.....	61-62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados para PCR.....16

Tabla 2. Número de transcritos identificados en los análisis de microarreglos.....32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de la morfología y cinética de proliferación de células <i>mt+</i> y <i>mt-</i>	20
Figura 2. Contenido de cobre, hierro y zinc en fibroblastos <i>mt+</i> y <i>mt-</i>	22
Figura 3. Viabilidad en fibroblastos <i>mt+</i> y <i>mt-</i> expuestos a concentraciones suprafisiológicas de cobre.....	24
Figura 4. Contenido de cobre, hierro y zinc en fibroblastos <i>mt+</i> y <i>mt-</i> expuestos a cobre.....	25
Figura 5. Verificación de la calidad de los RNAs y cDNAs.....	28
Figura 6. Clasificación funcional de los genes identificados por microarreglos	33-34
Figura 7. Genes asociados a mecanismos de protección celular	35

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometría de absorción atómica
Anti-IgG	Anticuerpo anti inmunoglobulina G
<i>atp7A</i>	Gen de la ATPasa de eflujo de cobre A
<i>b2m</i>	Gen de la beta 2 microglobulina
BSA	Albúmina de suero fetal bovino
<i>cat</i>	Gen de la catalasa
<i>ccs</i>	Gen de la chaperona de cobre para la superóxido dismutasa
C/EBP alfa	Proteína de unión a secuencias CCAAT - alfa
Cp	Ceruloplasmina
<i>cryab</i>	Gen de la cristalina alfa B
<i>ctr1</i>	Gen del transportador de cobre 1
Cu	Cobre
Cu:His	Complejo cobre – histidina
Cu-cp	Cobre ceruloplasmínico
Cu-no cp	Cobre no ceruloplasmínico
DMEM	Medio Dulbecco modificado
DMSO	Dimetil sulfóxido
Dmt1	Transportador de metales divalentes 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>dnaja1</i>	Gen de homólogo Hsp40, subfamilia A, miembro 1
<i>dnajc10</i>	Gen del homólogo Hsp40, subfamilia C, miembro 10

dNTPs	Desoxinucleótido trifosfatos
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
ESTs	Secuencias cortas expresadas
Fe	Hierro
FITC	Fluoresceína isotiocianato
<i>fth</i>	Gen de la cadena pesada de la ferritina
G	Fuerza centrífuga relativa
<i>g3pdh</i>	Gen de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
<i>hectd3</i>	Gen de la proteína con dominios HECT 3
<i>hfe</i>	Gen de la proteína de la hemocromatosis
<i>hmox1</i>	Gen de la hem-oxigenasa 1
HSE	Elemento de respuesta a estrés térmico
Hsf-1	Factor de transcripción de estrés térmico 1
<i>hsp105</i>	Gen de la proteína de estrés térmico 110
<i>hsp90aa1</i>	Gen de la proteína de estrés térmico de 90 KDa alfa
<i>hspa1a</i>	Gen de la proteína de estrés térmico
<i>hspa8</i>	Gen de la proteína de estrés térmico $\alpha 8$
<i>hspb1</i>	Gen de la proteína de estrés térmico 1
<i>hspb8</i>	Gen de la proteína de estrés térmico 8
Hsps	Proteínas de estrés térmico
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IRE	Elemento de respuesta a hierro
IRP-1	Proteína de respuesta a hierro 1

IRP-2	Proteína de respuesta a hierro 2
<i>fbxo11</i>	Gen de la proteína F-box 11
<i>mdm2</i>	Gen de la ubiquitin ligasa E3 MDM2
MOPS	Ácido 3- [N-morfolino] propanosulfónico
MRE	Elemento de respuesta a metales
Mt	Metalotioneína
<i>mt+</i>	Fibroblastos con copias silvestres de los genes <i>mt1</i> y <i>mt2</i>
<i>mt-</i>	Fibroblastos con copias mutadas de los genes <i>mt1</i> y <i>mt2</i>
Mt1	Metalotioneína 1
<i>mt1</i>	Gen de la metalotioneína 1
Mt2	Metalotioneína 2
<i>mt2</i>	Gen de la metalotioneína 2
Mt3	Metalotioneína 3
<i>mt3</i>	Gen de la metalotioneína 3
Mt4	Metalotioneína 4
<i>mt4</i>	Gen de la metalotioneína 4
MTF-1	Factor de transcripción de metales 1
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
Na	Sodio
p/v	Relación peso / volumen
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

<i>picalm</i>	Gen de la proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidil inositol
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
<i>sod1</i>	Gen de la superóxido dismutasa 1
<i>sod3</i>	Gen de la superóxido dismutasa 1
Sp1	Proteína de especificidad 1
TAE	Tampón tris-acetato EDTA
TE	Tampón tris EDTA
TFIIIA	Factor de transcripción general IIIA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades enzimáticas
<i>uba52</i>	Gen de la proteína ribosomal de fusión ubiquitina A-52
<i>ubc</i>	Gen de la ubiquitina c
<i>ube2w</i>	Gen de la enzima de conjugación de ubiquitina E2W (putativa)
<i>usp1</i>	Gen de la peptidasa específica de ubiquitina 1
UTR	Región no traducida
v/v	Relación volumen / volumen
Zn	Zinc
<i>znt1</i>	Gen del transportador de zinc 1

RESUMEN

La esencialidad del cobre para los organismos eucariontes reside en el papel que juega en la transferencia de electrones a enzimas que cumplen funciones tan indispensables y dispares como la respiración celular y la síntesis de neurotransmisores. Es esta misma capacidad de transferir electrones al fluctuar entre 2 estados de oxidación, Cu^{+1} y Cu^{+2} , la que confiere al metal el poder de catalizar la formación de especies radicales libres y lo hace en potencia tóxico cuando sus niveles exceden los requeridos por la célula. En vista de ello, las células cuentan con una maquinaria homeostática cuyos elementos regulan siempre muy de cerca la entrada, distribución, almacenamiento y salida del cobre. El presente trabajo pretende profundizar en las consecuencias fisiológicas y transcripcionales que arrastra la carencia de uno de estos mencionados elementos, metalotioneína, proteína involucrada en el almacenamiento de cobre y zinc y también asociada a una serie de funciones citoprotectoras. Con este propósito, se caracterizó dos líneas de fibroblastos de ratón, silvestres y mutantes para los genes de metalotioneína 1 y 2, en términos de proliferación, resistencia a concentraciones suprafisiológicas de cobre y abundancia intracelular de metales. La ausencia de metalotioneína no tuvo repercusión en estas variables, pero sí afectó la capacidad de la célula para regular el contenido interno de cobre frente a un exceso en la disponibilidad del metal. El comportamiento transcripcional de ambos tipos celulares frente a concentraciones suprafisiológicas de cobre fue posteriormente analizado a través de ensayos de hibridaciones en microarreglos. Nuestros resultados indican que, en fibroblastos expuestos a cobre, la ausencia de metalotioneína se correlaciona con un detrimento en la abundancia de

diversos genes vinculados al metabolismo de metales, el estrés oxidativo, el estrés térmico y el ciclo de ubiquitinación, lo que podría indicar que la pérdida de metalotioneína conlleva un cambio en el manejo intracelular de cobre que afecta el estado redox del fibroblasto. Alternativamente, la ausencia de metalotioneína podría afectar la vía de activación de Mtf-1 u otros factores de transcripción. Las observaciones aquí expuestas apoyan ambas posibilidades y sugieren que metalotioneína tiene un importante rol en los procesos de protección celular y en la red de regulación génica ligada a la adaptación celular a cobre.



ABSTRACT

Copper essentiality in eukaryotic organisms relies on the role the metal occupies in electron transfer to enzymes bearing functions as crucial and unlike as cellular respiration and neurotransmitter synthesis. It is the same ability to exchange electrons by alternating between two oxidating states, Cu^{+1} and Cu^{+2} , what confers to the metal the capacity to catalyze the formation of free radical species thus making it potentially toxic when its levels exceed cellular requirements. Taking this into account, cells are provided with a homeostatic machinery whose elements always regulate very closely the entrance, distribution, storage and exit of copper. The present work aims to gain a deeper insight into the physiological and transcriptional consequences triggered by the lack of one of these afore mentioned components, metallothionein, a protein involved in copper and zinc storage and also linked to a series of citoprotective functions. Whith this purpose, two cell lines, bearing wild type and mutant metallothionein 1 and 2 genes, were characterized in terms of proliferation, copper-supraphysiological concentrations and intracellular abundance of metals. The absence of metallothionein did not have effects on this variables, although it did affect the ability of the cell to regulate the internal content of copper when exposed to an excess in the metal availability. Transcriptional behaviour of both cell types cultivated in presence of copper supraphysiological concentrations was subsequently analyzed through microarray hybridization essays. Our results indicate that, in copper exposed fibroblasts, the absence of metallothionein is correlated with a decrease in the abundance of diverse genes linked to metal metabolism, oxidative stress, heat shock and the ubiquitination cycle, which could indicate that

metallothionein loss carries a change in intracellular copper handling that affects the cell redox state. Alternatively, the absence of metallothionein could affect the activation pathway Mtf-1 or other transcription factors. The results exposed in the present work support both possibilities and suggest that metallothionein has an important role in the cellular protection processes and the gene regulatory network associated to cellular adaptation to copper.

INTRODUCCIÓN

1. El cobre como nutriente

El cobre es un metal de transición indispensable para la ocurrencia de un amplio rango de procesos biológicos, entre los que se incluye la síntesis de neurotransmisores, de melanina, la respiración celular y la defensa contra radicales libres. El cobre puede existir en estado oxidado, Cu^{+2} , o reducido, Cu^{+1} , y su rol en la facilitación de la transferencia de electrones en diversas enzimas da cuenta de su esencialidad para la vida de todos los organismos eucariontes y también de algunos procariontes (Uauy y col, 1998).

2. El cobre como agente tóxico

Pese a su condición de nutriente esencial, la acumulación de cobre por sobre los requerimientos celulares puede llegar a ser tóxica a raíz de la naturaleza redox activa de este metal, que facilita entonces la formación de radicales libres con el consiguiente daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Para sobrellevar la dualidad del carácter indispensable pero en potencia tóxico del cobre, las células se han provisto de sofisticados mecanismos homeostáticos que les permiten manejar muy finamente la entrada, distribución, almacenamiento y salida del metal (Puig y col, 2002). Ello explica una destacable observación: al interior de una célula eucarionte es, en teoría, virtualmente imposible encontrar un átomo de cobre libre (Rae y col, 1999). Algunas de las principales moléculas encargadas de unir cobre están representada por la familia de las metalotioneínas.

3. Las metalotioneínas

Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular conformadas por 60 a 70 aminoácidos, de los que alrededor de un 30% corresponde a cisteínas (Tapiero y Tew, 2003). Esta especial estructura primaria es sumamente conservada en eucariontes y confiere a este grupo de proteínas la capacidad de coordinar con gran afinidad átomos de elementos traza tales como cobre y zinc (Palmiter, 1998). Existen cuatro genes funcionales conocidos para metalotioneína, denominados *mt1*, *mt2*, *mt3* y *mt4*, los que en humanos dan en conjunto origen a por lo menos 12 isoformas. Mientras que Mt3 es expresada sólo en el cerebro y Mt4 es específica de epitelio escamoso asociado a mucosa bucal, esófago e intestino grueso, Mt1 y Mt2 son ubicuas en los tejidos animales. Las metalotioneínas han sido ligadas a una serie de funciones, tales como el almacenamiento de cobre y zinc, la resistencia a metales pesados, la respuesta antiinflamatoria y antioxidante, la protección contra el daño oxidativo, la resistencia a radiación y también la proliferación y apoptosis (Palmiter, 1998; Coyle y col, 2002). A raíz de la variedad de procesos en las que parecen estar involucradas, no existe en la actualidad un consenso acerca de su rol biológico o sus mecanismos de acción, aunque sí es de común acuerdo que otorga protección frente a una variedad de condiciones que ponen en riesgo la integridad celular. Los modelos de animales mutantes generados en ratón se han visto aquejados por una variedad de deficiencias, tales como una exacerbada sensibilidad a los efectos tóxicos de plomo (Waalkes y col, 2004), cadmio (Masters y col, 1994), mercurio (Yoshida y col, 1999) y níquel (Wesselkamper y col, 2005), disminución en el desempeño neurocognitivo (Levin y col, 2006), reducción del tamaño axonal (Stankovic, 2005), mayor muerte neuronal secundaria (Natale y col,

2004) y disfunciones en la actividad de células macrófagas (Sugiura y col, 2004), entre otros.

4. Metalotioneína y regulación génica

Una serie de estudios ha explorado la capacidad de las metalotioneínas, que en condiciones fisiológicas se encuentran saturadas de zinc, para intercambiar este ión con factores de transcripción zinc dependientes. En modelos *in vitro* ha sido descrita la transferencia o remoción de zinc por parte de metalotioneína hacia factores de transcripción tales como Sp1 (Zeng y col, 1991a), TFIIIA (Zeng y col, 1991b), el receptor de estrógenos (Cano-Gauci y col, 1996), Tramtrack (Roesijadi y col, 1998) y Mtf-1 (Zhang y col, 2003). Este último factor de transcripción, cuyo nombre proviene de la denominación "*Metal Response Factor*" o factor de respuesta a metales, es de especial interés para la homeostasis de cobre ya que controla la transcripción de *mt1* y *mt2*, y también del transportador de eflujo de zinc *znt1*. Otros genes tales como alfa fetoproteína, C/EBP alfa, lipocalina 1 y gama-gcs también podrían estar regulados por este factor de transcripción (Lichtlen y col, 2001). Trabajos previamente realizados en nuestro laboratorio (Tapia y col, 2004) señalan que fibroblastos murinos de una línea celular de genotipo silvestre aumentan los niveles de transcrito para los genes *ccs*, *sod1* y *mt1* ante un incremento en el cobre disponible. Sin embargo, en una segunda línea celular cuyo genotipo difiere en la inserción de un codón de término cercano al inicio de la traducción en los genes que codifican para las metalotioneínas 1 y 2, los mismos mensajeros permanecen invariantes o disminuyen su abundancia. Estos resultados indican que frente a un idéntico factor externo, la presencia o ausencia de Mt determina

una respuesta celular diferencial y sugieren por lo tanto un papel de Mt como parte de la vía que regula la expresión de genes implicados en el metabolismo del cobre o el manejo del estrés oxidativo. Como una manera de profundizar en el papel de la metalotioneína en la homeostasis de cobre, el presente trabajo pretende contrastar el comportamiento fisiológico y transcripcional de dos líneas celulares, una silvestre y la otra mutante para los genes que codifican las metalotioneínas ubicuas 1 y 2, ante concentraciones suprafisiológicas del metal. Con este propósito, se caracterizó 2 líneas de fibroblastos de ratón silvestres y mutantes para los genes de metalotioneína 1 y 2 en términos de proliferación, resistencia a concentraciones suprafisiológicas de cobre y acumulación de metales. El comportamiento transcripcional de ambos tipos celulares en condiciones de exceso de cobre fue posteriormente analizado a través de ensayos de hibridación en microarreglos.

5. Hipótesis

La pérdida de metalotioneína repercute en la respuesta transcripcional global a un exceso de cobre, y no solo afecta la inducción de los genes controlados por el factor de transcripción Mtf-1.

6. Objetivo General

Estudiar las consecuencias transcripcionales y fisiológicas que conlleva la ausencia de Mt en la adaptación a concentraciones suprafisiológicas de cobre.

7. Objetivos Específicos

a. Caracterizar líneas celulares silvestres y mutantes para metalotioneína en términos de morfología, proliferación y contenido de metales en condiciones normales de cultivo.

Con el objeto de evaluar las repercusiones de la pérdida de Mt en células no expuestas a situaciones de estrés, fue contrastada la proliferación y la abundancia intracelular de metales en ambas líneas celulares, bajo condiciones de cultivo normales.

b. Determinar el efecto de la exposición a cobre en fibroblastos *mt+* y *mt-* en términos de viabilidad y contenido de metales.

En el desarrollo de este objetivo se analizó el comportamiento de variables como la sobrevivencia y la acumulación de metales en fibroblastos silvestres y mutantes para metalotioneína cultivados durante 48 horas en la presencia de Cu:His 50 ó 100 μ M.

c. Identificar transcritos cuya abundancia aumenta con la exposición a cobre en los fibroblastos *mt+* y *mt-*.

Para ello, las condiciones experimentales utilizadas en la ejecución de los objetivos **a** y **b** fueron replicadas con el objeto de obtener muestras de RNA que se enviaron al Departamento de Toxicología y Nutrición de la Universidad de California en Berkeley, donde fueron analizadas a través de la metodología de microarreglos (*microarrays*) y se generó una base de datos de los transcritos identificados como “regulados positivamente” ante la exposición a cobre en cada línea celular.

d. Caracterizar los transcritos presentes en la base de datos generada.

El análisis bioinformático y bibliográfico permitió determinar la identidad y la función de los transcritos en la base de datos y establecer diferencias en el comportamiento transcripcional de las líneas silvestre y mutante para metalotioneína, e identificar de este modo procesos donde la presencia de metalotioneína puede ser de relevancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Líneas Celulares

Para el desarrollo del presente trabajo se hizo uso de dos líneas de fibroblastos de ratón inmortalizados por infección viral (Kelly y Palmiter, 1996). Ambas provienen de la progenie del cruce de una cepa de ratones mutantes para el gen de la ATPasa de eflujo de Menkes (Kelly y Palmiter, 1996), *atp7a*, localizado en el cromosoma X, con una segunda cepa de ratones mutantes para los genes que codifican las metalotioneínas 1 y 2 (Masters y col, 1994). Así se dio origen a las líneas celulares *mt+* y *mt-* utilizadas en esta tesis, las que fueron donadas amablemente por el Doctor Johnathan Gitlin de la Universidad de Washington.

1.2. Anticuerpos

a) Anti-Actina: adquirido a través de Sigma (Illinois, EUA), es un anticuerpo monoclonal producido en ratón que reconoce un epítoto conservado que se localiza en el extremo C terminal y es común a todas las isoformas de actina.

b) Anti-IgG: es un anticuerpo monoclonal contra la inmunoglobulina G de ratón comercializado por Rockland (Pensilvania, EUA), el que además está conjugado a fluoresceína isotiocianato (FITC) por lo que emite un máximo de fluorescencia a una longitud de onda de 528 nm.

1.3. Sales y Reactivos

La totalidad de las sales y reactivos utilizados fue adquirida a los fabricantes Merck (New Jersey, EUA), Sigma (Illinois, EUA) y Winkler (Santiago, Chile).

2. MÉTODOS

2.1. Cultivo y tratamiento de líneas celulares

2.1.1. Mantención de líneas celulares en cultivo

Las líneas *mt+* y *mt-* fueron sistemáticamente mantenidas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂, suplementadas con medio Dulbecco modificado (DMEM) con 10% (v/v) de suero fetal bovino, penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL), Cu 0,44 µM (Gibco BRL, Maryland, EUA), en placas circulares de 65 ó 100 mm de diámetro (Tapia y col, 2004). Al cabo de 2 a 3 días en la placa, cuando las células alcanzaban cerca de un 80% de confluencia, eran lavadas 2 ó 3 veces con una solución tampón de fosfato salino pH 7,4 (PBS) y recuperadas a través de una tripsinización suave con 0,05% tripsina y 5,3 mM EDTA · 4Na en PBS por alrededor de 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente eran centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos, resuspendidas en 1 mL de PBS y nuevamente centrifugadas por otros 3 minutos a 3000 rpm, para luego ser sembradas en una nueva placa con medio fresco a una densidad aproximada de 3000 células/cm² (2.1.2.).

2.1.2. Conteo por tinción con azul tripán

El número de células vivas en una determinada muestra fue determinado mediante el conteo en una cámara de Neubauer de células teñidas con azul tripán diluidas en una proporción 1:10 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Montana, EUA) (Armendariz y col, 2006).

2.1.3. Almacenamiento de líneas celulares

Con el objeto de criopreservar las líneas de fibroblastos, las células fueron recuperadas desde placas de cultivo mediante el protocolo de tripsinización descrito en 2.1.1. y resuspendidas en DMEM con un 20% (V/V) de suero fetal bovino y un 10% (V/V) de dimetil sulfoxido (DMSO) en una concentración cercana a 10^6 fibroblastos/mL (ver 2.1.2.).

2.1.4. Tratamientos con cobre

Ambas líneas celulares fueron sometidas a tratamientos con concentraciones de cobre, donde las condiciones de cultivo estándar descritas en 2.1.1. fueron usadas como estado de referencia o control. En esta situación, la concentración de cobre en el medio es de $0,44 \mu\text{M}$ (Tapia y col, 2004). Fibroblastos *mt+* y *mt-* fueron sembrados a una densidad aproximada de $10,2 \times 10^3$ células/cm², y transcurridas 20 horas post-siembra, el medio nutritivo fue reemplazado por medio fresco sin suplemento de cobre o por medio con un suplemento de 50 ó 100 μM de complejo Cu-His (en proporción 1:10), al que estuvieron expuestas durante 48 horas. Una vez acabado el período de tratamiento, las

células fueron procesadas según fuese pertinente para aislar RNA (2.3.3.), cuantificar metales (2.2.1.), o estimar viabilidad en un ensayo de MTT (2.2.3.) o azul tripán (2.1.2.).

2.2. Procedimientos generales

2.2.1. Cuantificación de metales

La cuantificación de la abundancia intracelular de cobre, hierro y zinc fue registrada en fibroblastos *mt+* y *mt-* sembrados en placas de 6 pocillos sometidos a tratamientos con cobre (2.1.4.). El medio fue retirado y los fibroblastos ya tratados se lavaron 2 veces con PBS. Las células fueron posteriormente sometidas a tripsinización (2.1.1.), centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos y resuspendidas en 150 μ L de PBS. De este volumen, 50 μ L fueron destinados para cuantificar proteínas (2.2.2.) y los 100 μ L restantes (aproximadamente 8×10^5 células), resuspendidos en 1 mL de ácido nítrico 65% (v/v) en agua desionizada bi destilada. Esta resuspensión celular fue incubada por 16 horas a 65 °C, con el propósito de completar la lisis ácida (González y col, 1999). Para cuantificar el contenido intracelular de cobre y hierro se utilizó un espectrómetro de absorción atómica (AAS) con horno de grafito SIMMA 6100 (Perkin Elmer, Massachussets, EUA), cuyo límite de detección circunda las partes por billón (ppb). La abundancia de zinc, en cambio, fue estimada en un espectrómetro de absorción de llama (2280 Perkin Elmer, Massachussets, EUA) que tiene un límite del orden de partes por millón (ppm). A través de curvas de calibración con diluciones seriadas de estándares para cada metal (JT Baker, New Jersey, EUA), la lectura de cada muestra fue expresada en nmoles y posteriormente normalizada por miligramo de proteína (2.2.2.).

2.2.2. Cuantificación de proteínas

La abundancia de proteínas en distintas muestras fue cuantificada a través del método de Bradford (Bradford, 1976). $2-4 \times 10^5$ células fueron lisadas en NaOH 0,5 N, Tritón 0,1 % v/v y diluidas en agua destilada y reactivo de Bradford en proporción 1:8:1. La cuantificación fue efectuada a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer MBA 2000 (Massachusetts, EUA), y la concentración de cada muestra fue interpolada por medio de una curva de calibración hecha con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) (Gibco BRL, Maryland, EUA).

2.2.3. Estimación de la viabilidad celular (MTT)

Las células tratadas en placas de 24 pocillos fueron lavadas con PBS e incubadas durante 1 hora a 37 °C en 300 μ L de medio DMEM suplementado con 5 mg/mL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Cole, 1986). Una vez finalizado el período de incubación, el medio fue reemplazado por 200 μ L de isopropanol 70 % v/v HCl 0,04 M para permitir durante 15 minutos a temperatura ambiente la solubilización de la sal de formazán, producto de la metabolización mitocondrial de MTT. La abundancia de formazán en cada pocillo fue estimada por colorimetría, mediante el registro en un lector de Elisa Elx800 (Bio-tek Instruments, Vermont, EUA) de la diferencia en la absorción a 570 y 630 nm. Los valores obtenidos se encuentran expresados como porcentaje del promedio de las muestras control.

2.2.4. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Fibroblastos *mt+* y *mt-* fueron sembrados sobre cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos, en una densidad aproximada de $10,2 \times 10^3$ células/cm². Al cabo de 24 horas, cada pocillo fue lavado 2 veces con PBS y se procedió a fijar las células con una solución de formaldehído 3,7% v/v en PBS (Sigma) por 15 minutos a temperatura ambiente. Para permeabilizar las células, la solución de fijación fue reemplazada por formaldehído 3,7% v/v Tritón X-100 0,2% v/v (Merck) y tras incubarse por 5 minutos a temperatura ambiente, se hicieron 2 lavados suaves con PBS. A continuación, los fibroblastos fueron incubados a 37 °C con una solución de BSA al 3% p/v (Gibco BRL, Maryland, EUA) en PBS durante 45 minutos. El anticuerpo primario (anti-actina) fue diluido en una proporción de 1:500 en BSA 3% p/v e incubado por 1 hora a 37 °C. Previo lavado con PBS, los fibroblastos fueron expuestos al anticuerpo secundario (anti-IgG conjugado a FITC) en una dilución de 1:250 en BSA 3% p/v a lo largo de 1 hora a 37 °C, tras lo cual fueron lavados 3 veces con PBS y 1 vez con agua destilada. Por último, los cubreobjetos fueron montados sobre vidrio y analizados en un microscopio de epifluorescencia Labophot-2 (Nikon, Tokio, Japón). Las imágenes fueron capturadas mediante una cámara Digital Science DC120 (Kodak, Nueva York, EUA). A modo de control, fueron incluidas preparaciones donde no se incubó con el primer o el segundo anticuerpo (Armendariz y col, 2006).

2.3. Procedimientos de biología molecular

Las técnicas de biología molecular fueron desarrolladas acorde a los protocolos descritos en Ausubel y col, 1999.

2.3.1. Electroforesis

La electroforesis de muestras de DNA se efectuó en geles de agarosa al 1-1,5% p/v en TAE 1x (Acetato de Tris 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5), solución que además fue usada como tampón electroforético. Por otro lado, las electroforesis de RNA fueron hechas en geles denaturantes de agarosa al 1,2% p/v en formaldehído 7% v/v MOPS 1X, donde el tampón electroforético utilizado fue también MOPS 1X (Sambrook y col, 1989). Para teñir los geles se usó bromuro de etidio al 0,1% v/v (Ausubel y col, 1999), lo que permitió que las bandas fuesen visibles en un transiluminador de luz ultravioleta (TFX 20.M, Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, Francia). La fotografía de cada gel fue capturada mediante una cámara Dc290 (Kodak, Nueva York, EUA) para análisis posteriores.

2.3.2. Cuantificación de DNA y RNA

La concentración de ácidos nucleicos fue determinada por medio de sondas fluorescentes: Picogreen para DNA de doble hebra y Ribogreen para RNA (Invitrogen, California, EUA). Cada muestra fue diluida en tampón TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) entre 200 y 2000 veces, y el fluoróforo correspondiente fue agregado en una proporción de 1:400. La fluorescencia emitida a 520 nm se registró en un fluorímetro Spectramax Gemini Em (Molecular Devices, California, EUA) tras excitar la muestra a

una longitud de onda de 480 (Picogreen) o 485 nm (Ribogreen). Junto con las muestras se incluyó una curva de calibración confeccionada con diluciones seriadas de DNA o RNA de concentración conocida, lo que permitió transformar las lecturas de fluorescencia a concentración de ácidos nucleicos. Para cuantificar DNA de hebra simple, se registró en un espectrofotómetro MBA 2000 (Perkin Elmer, Massachussets, EUA) la absorbancia de las muestras a 260 nm en una cubeta de cuarzo. Del mismo modo, la calidad de las muestras de RNA fue también verificada mediante el registro de la absorbancia a 240, 260 y 280 nm.

2.3.3. Extracción de RNA total

Los fibroblastos sometidos a los tratamientos descritos en 2.1.4. fueron tripsinizados y centrifugados de acuerdo al protocolo establecido en la sección 2.1.1. A continuación fueron resuspendidos en 1 mL de Tri Reagent (Ambion, Texas, EUA) y sometidos a ruptura mecánica con jeringas para insulina de 1 mL (BD Ultra-Fine, Nueva Jersey, EUA). Esta resuspensión fue incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente, mezclada con 0,2 mL de cloroformo, incubada por otros 15 minutos y centrifugada a 12000 x g, 4 °C, por 15 minutos. El sobrenadante resultante, que contenía el RNA, fue transferido a un nuevo tubo, mezclado con 500 µL de isopropanol, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugado por 8 minutos a 12000 x g y 4 °C. El pellet fue resuspendido en etanol 75% v/v y centrifugado a 7500 x g, 4 °C, por 5 minutos. Finalmente, los restos de etanol se evaporaron incubando las muestras a 37 °C y los RNAs fueron resuspendidos en 30 µL de agua libre de nucleasas. La integridad del RNA fue verificada por electroforesis en geles denaturantes de agarosa (2.3.1.) y la

pureza de cada muestra fue evaluada al registrar razón entre las absorbancias a longitudes de onda de 260/280 nm (relación entre ácidos nucleicos y proteínas) y 260/240 nm (relación entre ácidos nucleicos y fenoles) en un espectrofotómetro MBA 2000 (Perkin Elmer, Illinois, EUA).

2.3.4. Síntesis de cDNAs

Para sintetizar cDNAs de hebra simple se utilizó como templado 2 µg de RNA total, el que junto con 0,5 µg de oligodT de entre 12 y 15 bases (Promega, Wisconsin, EUA) fue denaturado a 70 °C por 5 minutos. Posteriormente, 200 unidades de transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Wisconsin, EUA) y DNTPs a una concentración de 12,5 µM (Invitrogen California, EUA) fueron añadidos a la reacción, que fue incubada por 90 minutos a 42 °C y finalmente detenida al inactivar la enzima a 70 °C por 15 minutos. Los cDNAs fueron a continuación cuantificados por espectrofotometría (2.3.2.) y diluidos a una concentración de 200 ng/µL para su uso en reacciones de PCR (2.3.5.). Con el objeto de ratificar que cada cDNA permitiese detectar la presencia de transcritos, el producto de cada síntesis fue sometido a una prueba donde se buscaba amplificar con los respectivos partidores, los amplicones de *mt1* y *g3pdh* mediante PCR (2.3.5).

2.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los transcritos de *mt1* y *g3pdh* fue efectuada en una mezcla de 8 ng/µL de cDNA templado, dNTPs 10 mM, MgCl₂ 50 mM, 10 mM de cada partidor y 0,1 unidades/µL de Taq polimerasa (producida en nuestro laboratorio), en un volumen

final de 25 μ L. Las reacciones fueron incubadas en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Massachusetts, EUA). El protocolo de amplificación constó de: a) un paso de denaturación inicial a 94 °C por 2 minutos, b) 30 ciclos de amplificación divididos en: 1) denaturación, 94 °C por 30 segundos, 2) asociación de los partidores, por 30 segundos a la temperatura correspondiente (Tabla 1), 3) extensión, 72 °C por 60 segundos, y c) extensión final, 72 °C durante 5 minutos. La secuencia de los partidores utilizados, su respectiva temperatura de asociación y el tamaño del amplicón correspondiente se encuentran detallados en la Tabla 1. La presencia de amplicones como producto de esta reacción fue ratificada por electroforesis en geles de agarosa (2.3.1.).

Gen	Partidor Sentido (5'→3')	Partidor Antisentido (5'→3')	Temperatura de Asociación (°C)	Tamaño Amplicón (pb)
<i>g3pdh</i>	accacagtccatgccaatcac	tccaccacctgttgctgta	62	452
<i>mtl</i>	cctgggctgctccaat	taggaagacgctgggtg	58	134

Tabla 1. Partidores utilizados para PCR. En la tabla se incluyen las secuencias de los partidores utilizados en la amplificación por PCR convencional de los transcritos de *mtl* y *g3pdh*, así como también la temperatura de asociación empleada en la reacción de PCR y el tamaño esperado de cada amplicón.

2.3.6. Hibridación en microarreglos (*microarrays*)

Muestras únicas de RNA de fibroblastos *mt+* y *mt-* cultivados durante 48 horas con 50, 100 μ M, o en ausencia de Cu:His (grupo control) fueron enviadas al Departamento de Ciencia Nutricional y Toxicología de la Universidad de Berkeley, donde se usaron como sustrato para la síntesis de cDNA marcado con Cy3 o Cy5. Estos cDNAs se hibridaron posteriormente en láminas de vidrio, fabricadas en las Instalaciones de Genómica del Colegio de Recursos Naturales de la Universidad de

Berkeley, que contenían cerca de 11000 secuencias cortas expresadas (*ESTs*) (Armendariz y col, 2006). Las hibridaciones fueron realizadas en triplicados técnicos, y se efectuaron las siguientes comparaciones: a) *mt+* sin Cu:His contra *mt+* 50 μ M Cu:His, b) *mt+* sin Cu:His contra *mt+* 100 Cu:His, c) *mt-* sin Cu:His contra *mt-* 50 Cu:His, d) *mt-* sin Cu:His contra *mt-* 100 Cu:His. Las señales de hibridación que diferían significativamente del resto fueron identificadas mediante el análisis de puntos fuera de tendencia (Loguinov y col, 2004).

2.4. Análisis Bioinformático

2.4.1. Asignación de la identidad de secuencias cortas expresadas (*ESTs*)

La identidad de 278 secuencias cortas expresadas (*ESTs*) identificadas en los análisis de hibridación (resultados parcialmente publicados en Armendariz y col, 2006) fue asignada a través del sistema de búsqueda del Centro Nacional de Bioinformática de los Estados Unidos (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El código correspondiente a cada EST fue rastreado en la base de datos “Unigene”, que agrupa distintas secuencias que corresponden a transcritos de un mismo gen. El identificador Unigene fue ingresado a la base de datos “Gene” con el fin de obtener la identidad e información referente a cada uno de los transcritos en la base de datos.

2.4.2. Clasificación funcional de genes

Las 278 secuencias cortas expresadas (*ESTs*) identificadas fueron clasificadas de acuerdo al proceso biológico que estuviesen asociadas por medio de la base de datos de Gene Ontology para ratón (http://www.informatics.jax.org/searches/GO_form.shtml),

que proporciona un vocabulario ordenado de manera jerárquica que describe los productos génicos de este organismo (Ashburner y col, 2000).

RESULTADOS

1. Caracterización de líneas celulares

1.1. Morfología y proliferación

En 1994, Masters y colaboradores insertaron, mediante recombinación homóloga, codones de término de la traducción en los alelos para *mt1* y *mt2* de células troncales de ratón, que luego utilizaron para dar origen a una cepa de ratones mutantes homocigotos. El posterior cruce de esta cepa de ratones con una segunda mutante espontánea para el gen de la ATPasa de Menkes asociado al cromosoma X permitió la creación de cuatro distintas líneas celulares de fibroblastos embrionarios, de genotipo *mt 1, 2 -/- atp7a -/Y*, *mt 1, 2 +/- atp7a -/Y*, *mt 1, 2 -/- atp7a +/Y*, y *mt 1, 2 +/- atp7a +/Y* (Kelly y Palmiter, 1996). Para el desarrollo del presente trabajo se hizo uso de las líneas *mt 1, 2 +/- atp7a +/Y* y *mt 1, 2 -/- atp7a +/Y*, designadas de aquí en adelante como *mt+* y *mt-*, o simplemente, silvestre y mutante. Al microscopio de luz invertida, los fibroblastos *mt+* y *mt-* resultaron ser indistinguibles los unos de los otros, sin haber diferencias en tamaño ni morfología, como queda ilustrado en los paneles A y B de la Figura 1. La organización del citoesqueleto de actina, evidenciada en las inmunofluorescencias de los paneles C y D, tampoco presentó diferencias obvias entre ambas líneas.

El patrón de proliferación de ambos tipos celulares (Figura 1, panel E) resultó ser similar, compuesto por una primera fase de crecimiento lento seguida de otra de crecimiento exponencial que perdura hasta alcanzar la confluencia. La velocidad de duplicación en esta última etapa (días 2, 3, 4 y 5) fue estimada en 22 horas. La

equivalencia entre el número de células y la cantidad de proteínas totales fue de aproximadamente 300 μg por cada 10^6 fibroblastos para ambas líneas celulares.

Los resultados indican que en condiciones normales de cultivo no existen diferencias ni en la morfología ni en la capacidad proliferativa de los fibroblastos *mt+* y *mt-*.

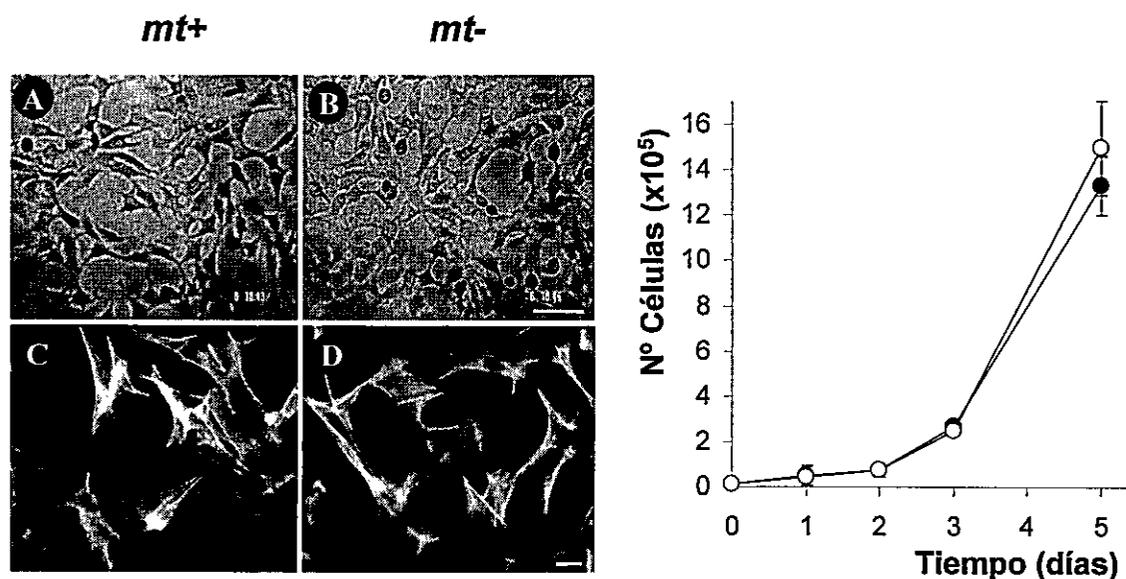


Figura 1. Comparación de la morfología y cinética de proliferación de células *mt+* y *mt-*. Los paneles A y B muestran, respectivamente, fotografías de fibroblastos silvestres y mutantes para metalotioneína, capturadas a través de un microscopio de contraste de luz invertida. La barra blanca representa 10 μm de longitud. Los patrones de configuración de los filamentos de actina para la línea *mt+* (panel C) y *mt-* (panel D) fueron retratados por medio de la técnica de inmunohistoquímica. La curva de proliferación, a la derecha, fue construida mediante el registro diario por tinción con azul tripán del número de células en condiciones normales de cultivo a lo largo de 5 días. Los datos graficados corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas y su correspondiente error estándar. Círculos negros (●)=*mt+*, círculos blancos (○)=*mt-*.

1.2. Contenido de metales

La concentración de cobre total en el plasma sanguíneo murino es cercana a 15 μM (McArdle y Erlich, 1991). Entre un 70 y un 90% de este cobre se encuentra unido a ceruloplasmina y es llamado cobre ceruloplasmínico o Cu-Cp. La fracción remanente es considerada como disponible para los requerimientos celulares y recibe el nombre de Cu-noCp (Linder y col, 1999). El cobre presente en el medio de cultivo, en una concentración de 0,44 μM (Tapia y col, 2003), está entonces por debajo de los niveles fisiológicos. Hierro y zinc se encuentran, respectivamente, en concentraciones de 2,69 y 3,80 μM en el medio, lo que también los sitúa en el rango sub-fisiológico (Tapia y col, 2003).

A raíz de la capacidad de las metalotioneínas para unir cobre y zinc, y de que las fluctuaciones en los niveles de estos metales pueden alterar el contenido de hierro (Tapia y col, 2003), las concentraciones de cobre, hierro y zinc presentes en los fibroblastos *mt+* y *mt-* crecidos en medio de cultivo sin suplemento de cobre fueron determinadas por espectrometría de absorción atómica (AAS) (Figura 2). En estas condiciones, el nivel intracelular de estos tres elementos no difiere entre líneas celulares.

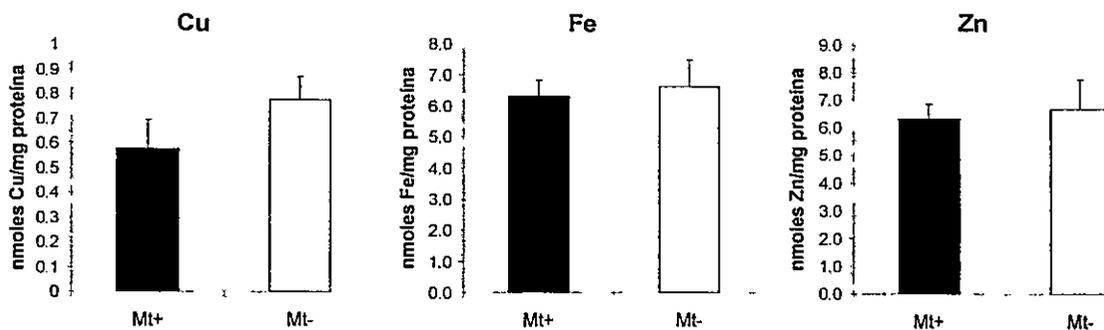


Figura 2. Contenido de cobre, hierro y zinc en fibroblastos *mt+* y *mt-*. Fibroblastos mutantes y silvestres para metalotioneína fueron mantenidos en condiciones estándar de cultivo hasta alcanzar un 80-90% de confluencia, para luego registrar mediante AAS la abundancia intracelular de cobre, hierro y zinc. Los valores expresados corresponden al promedio de 4-6 réplicas biológicas normalizado según el contenido de proteínas en cada muestra y el respectivo error estándar. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos para ambas líneas celulares en una prueba de T ($p < 0,05$).

2. Efecto de concentraciones supra fisiológicas de cobre sobre fibroblastos *mt+* y *mt-*

Una vez establecidas las diferencias y similitudes entre ambas líneas celulares en términos de proliferación y contenido de metales en condiciones normales de cultivo, quedó abierta la interrogante de cómo estas variables se verían afectadas por la presencia de un exceso de cobre, y qué incidencia tendría en ello la ausencia de metalotioneína. Con el objeto de resolver esta pregunta, fibroblastos de ambos tipos fueron cultivados con un suplemento de 50 ó 100 μM de Cu-His, y tras 48 horas de exposición, se recolectó información acerca de la viabilidad celular y la abundancia intracelular de metales, resultados que son detallados a continuación.

2.1. Viabilidad

La viabilidad de los fibroblastos expuestos a Cu:His fue registrada mediante dos distintas técnicas: el ensayo de reducción de MTT y el conteo de células por tinción con azul tripán. El uso simultáneo de estas dos estrategias de medición se ampara en que, pese a que el ensayo de MTT está sujeto a menos fuentes de error experimental que el conteo directo de células, los resultados generados por medio de esta técnica dependen de la actividad mitocondrial, la que es susceptible de ser alterada ante un exceso de cobre (Arciello y col, 2005). El análisis estadístico de los datos graficados en la Figura 3 señala que ambas líneas celulares son igualmente afectadas por el Cu:His en las dosis suministradas. La magnitud de este impacto, si existe tal, no alcanza a verse reflejada en el conteo de células, y, pese a que resulta tentador especular que la tendencia de los valores registrados para Cu:His 100 μM apunta a un detrimento en la viabilidad de los fibroblastos *mt-* que solo tiene cabida en la línea mutante, el ensayo de MTT indica que, bajo estas condiciones, la viabilidad se reduce en ambas líneas en igual medida – aproximadamente un 8%. Ambas técnicas sugieren entonces resultados compatibles, que describen en ambos tipos de fibroblastos una resistencia similar frente al cobre en el rango de concentraciones suprafisiológicas suministradas.

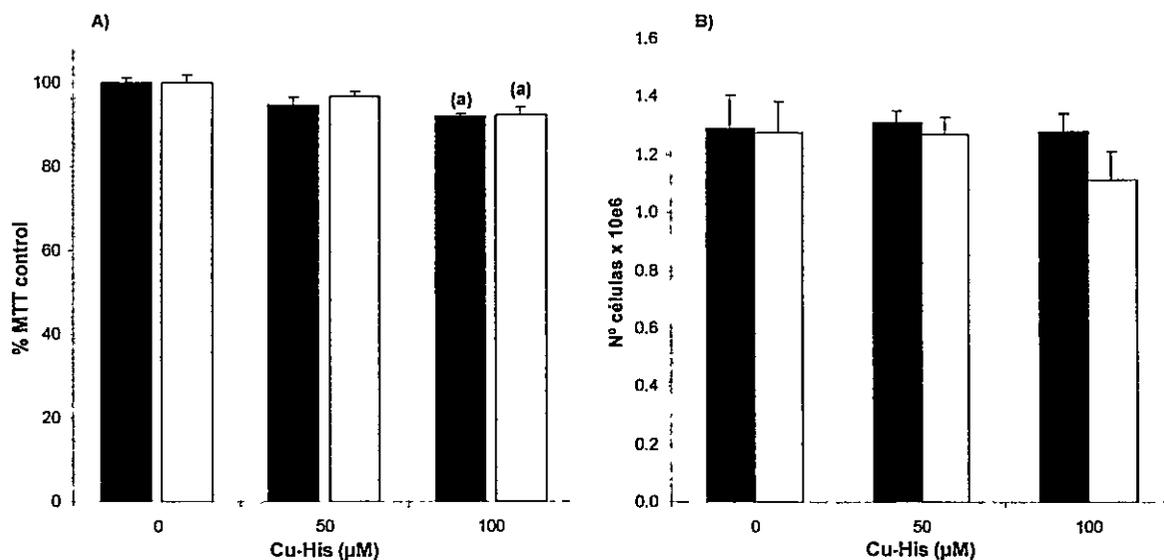


Figura 3. Viabilidad en fibroblastos *mt+* y *mt-* expuestos a concentraciones suprafiológicas de cobre. Células *mt+* y *mt-* fueron expuestas a lo largo de 48 horas a concentraciones de 0, 50 y 100 µM Cu-His. El panel A representa la cuantificación de la viabilidad celular en las condiciones mencionadas por medio del ensayo colorimétrico de MTT. Para cada línea celular, los valores son expresados como porcentaje del promedio de la lecturas correspondientes a las muestras control. El panel B corresponde al registro del número de células a través de la tinción con azul tripán y su posterior conteo. En ambos paneles, las barras grafican el promedio de 3-4 réplicas biológicas y el respectivo error estándar. La letra a indica que el valor es estadísticamente diferente al registrado para el control (sin Cu-His) de la misma línea celular según la prueba de T ($p < 0,05$). Barras negras (■) = *mt+*, barras blancas (□) = *mt-*.

2.2. Contenido de cobre, hierro y zinc

El efecto de la exposición a concentraciones crecientes de cobre en el contenido interno de metales de los fibroblastos *mt+* y *mt-* fue evaluado a través de la técnica de espectrometría de absorción atómica (AAS). Los resultados, en la Figura 4, evidencian un incremento estadísticamente significativo en el contenido intracelular de cobre en la línea *mt+* (2,5 veces) cuando las células son expuestas a 100 µM de Cu:His. Por el contrario, la línea *mt-* no presenta ninguna fluctuación susceptible de ser considerada, acorde con lo esperado dada la ausencia de metalotioneína al interior de la célula. Estos resultados apuntan a que la capacidad de regular la homeostasis del cobre por medio del

secuestro y almacenamiento del metal al interior de la célula se encuentra mermada en los fibroblastos mutantes. El contenido de hierro, por el contrario, se redujo a cerca de la mitad en ambas líneas celulares (prueba de T, $p < 0,05$). La abundancia de zinc presenta, en apariencia, tendencias opuestas en ambos tipos de fibroblastos: mientras que las células silvestres parecen disminuir el contenido del metal al aumentar la concentración de cobre, la línea *mt-* podría registrar un leve aumento en la abundancia de zinc bajo las mismas condiciones. Sin embargo, la prueba de T no arrojó diferencias estadísticas ni entre dosis ni entre líneas, así como tampoco fue posible determinar un efecto de las concentraciones de cobre o de la ausencia de Mt a través de una prueba de Anova ($p < 0,05$). La exposición a cobre no modificó entonces solo el contenido de este metal en la línea silvestre, sino que también alteró la abundancia de hierro tanto en la línea *mt+* como en la *mt-*. Ello sugiere la existencia de puntos de interconexión en el metabolismo de estos dos metales.

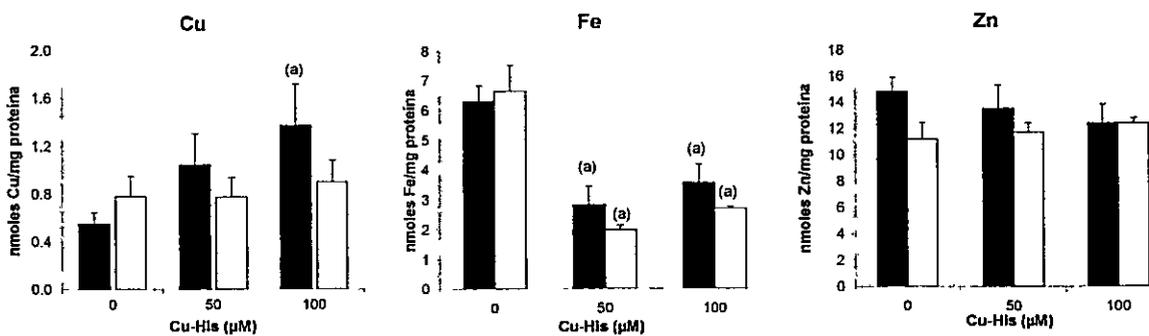


Figura 4. Contenido de cobre, hierro y zinc en fibroblastos *mt+* y *mt-* expuestos a cobre. Las líneas celulares *mt+* y *mt-* fueron cultivadas bajo concentraciones de 0, 50 y 100 μM de Cu-His durante 48 horas, período tras el cual se cuantificó la abundancia de cobre, hierro y zinc mediante AAS. Los valores corresponden al promedio de 3-4 réplicas biológicas y se encuentran normalizados de acuerdo al contenido de proteínas en cada muestra. La letra (a) identifica a los valores que difieren estadísticamente del control (sin Cu:His) de la misma línea celular de acuerdo a la prueba T de Student ($p < 0,05$). Barras negras (■) = *mt+*, barras blancas (□) = *mt-*.

3. Expresión génica en fibroblastos expuestos a cobre

3.1. Extracción de RNAs y síntesis de cDNAs

Para posibilitar el análisis de la expresión génica en fibroblastos *mt+* y *mt-* sometidos a cobre por sobre los niveles fisiológicos, ambas líneas celulares fueron expuestas durante 48 horas a 50 y 100 μM de Cu:His. Se incluyó además un grupo control, al que no se le suministró suplemento de Cu:His. El RNA de estos fibroblastos fue aislado y utilizado como sustrato para la síntesis de cDNA. Dada la distorsión que podía arrastrar en posteriores análisis el emplear RNAs parcialmente degradados o contaminados, cada una de las muestras fue sometida a diversos controles que permitiesen asegurar su adecuada calidad. En primera instancia, la electroforesis en geles denaturantes de agarosa permitió verificar la presencia de los RNAs ribosomales 28S y 18S, evidenciada en dos bandas bien definidas, y una tercera banda de menor tamaño correspondiente al 5S. La relación entre las intensidades de las bandas 28S y 18S debe estar entre 1,5 a 2,5: 1. El panel A de la Figura 5 presenta la separación electroforética de RNAs de fibroblastos *mt+* y *mt-* que cumplen las características mencionadas. Otro criterio de entrada radicó en las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/240 nm, cuyos valores dependen de la abundancia de proteínas y fenoles, respectivamente, contaminantes que pueden interferir con la actividad de la transcriptasa reversa en la síntesis de cDNA. Para el cuociente 260/280 nm el rango de tolerancia es de entre 1,8 y 2,1, mientras que para 260/240 nm se permiten índices entre 1,7 y 1,9. Las lecturas para estos dos cuocientes, obtenidas para el mismo grupo de muestras del panel A, se detallan en el panel B en conjunto con la masa total de RNA extraído en cada caso,

y según se aprecia, las fluctuaciones de ambos valores son acordes con los límites descritos. A continuación cada uno de los RNAs fue sometido a una reacción de transcripción reversa. A fin de verificar la capacidad de detectar la presencia de algunos de los transcritos de interés en los cDNAs de hebra simple así generados, se efectuaron reacciones de PCR para *g3pdh* y *mt1* en cada una de las muestras de cDNA. El panel C de la Figura 6 presenta las bandas electroforéticas de estos amplicones.

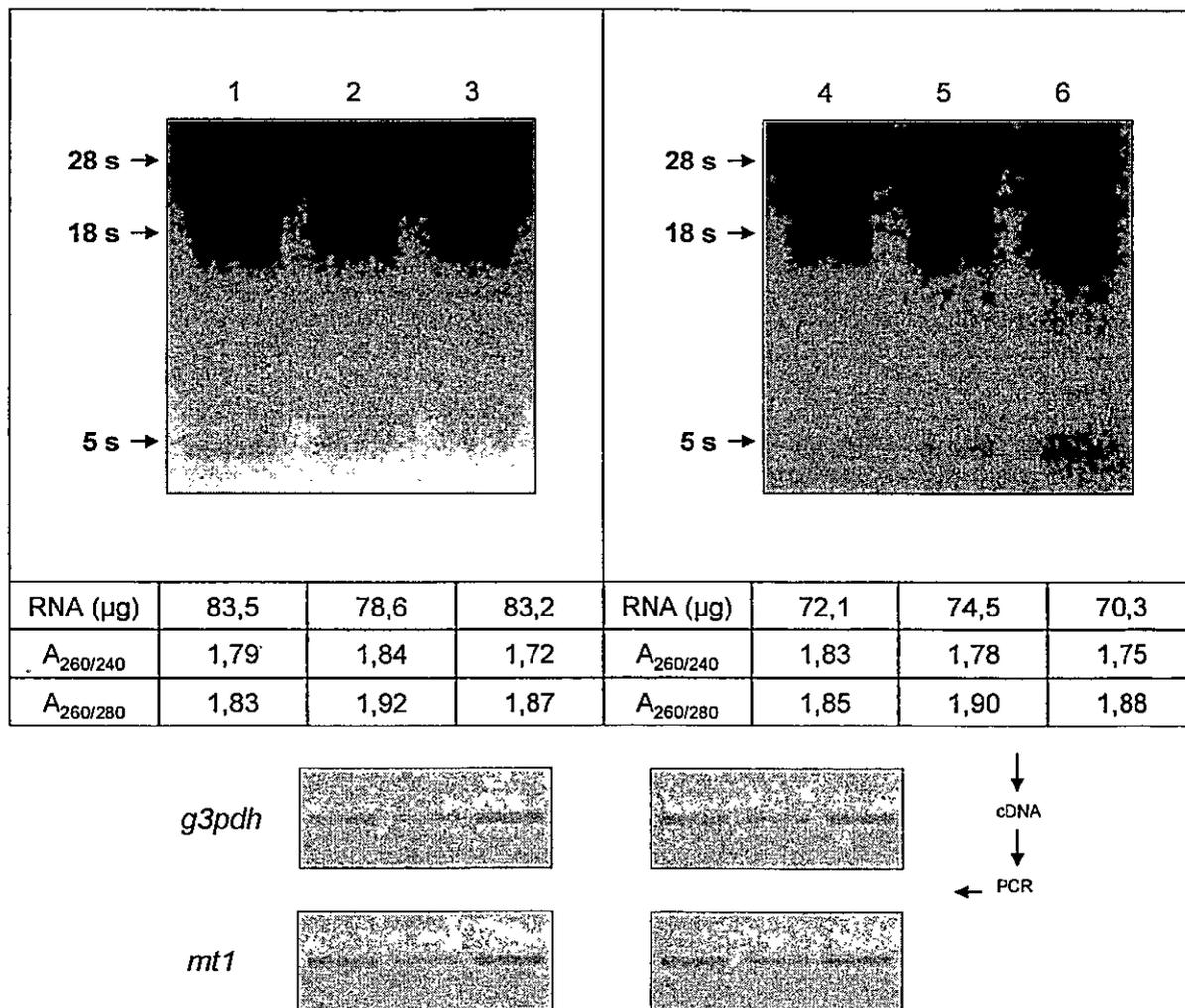


Figura 5. Verificación de la calidad de los RNAs y cDNAs. El panel A presenta la electroforesis en un gel denaturante de agarosa al 1,5% de RNAs extraídos desde fibroblastos *mt+* y *mt-*, expuestos durante 48 horas a 0, 50 ó 100 μM de Cu:His. Carril 1: *mt+* 0 μM Cu:His, carril 2: *mt+* 50 μM Cu:His, carril 3: *mt+* 100 μM Cu:His, carril 4: *mt-* 0 μM Cu:His, carril 5: *mt-* 50 μM Cu:His, carril 6: *mt-* 100 μM Cu:His. El panel B detalla la cantidad de RNA total (μg) producto de cada extracción, además de las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/240 nm. El panel C presenta las bandas electroforéticas de amplicones para *g3pdh* y *mt1* generados a partir de cDNAs provenientes de los RNAs extraídos.

3.2. Clasificación de los genes identificados por microarreglos

Los RNAs extraídos fueron hibridados en microarreglos en triplicados técnicos (Armendariz y col, 2006). El análisis estadístico de las réplicas se enfocó en detectar, para cada línea celular, aquellos puntos de hibridación que representaban los transcritos cuya abundancia aumentó frente a los tratamientos con cobre. La identidad de un total de 275 secuencias (la lista completa se encuentra en las Tablas 1-5 de Material Anexo) fue determinada a través de la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La Tabla 2 detalla el número de secuencias cortas expresadas (ESTs) que se consideraron como sujetas a un incremento de abundancia en cada condición y qué parte de ellas cuenta con una anotación asociada. Cabe destacar que la cantidad de transcritos detectados se vio aumentada en ambas líneas celulares al incrementar la dosis de cobre. La clasificación funcional según el proceso biológico descrito en la base de datos de Gene Ontology (http://www.informatics.jax.org/searches/GO_form.shtml) de la porción de las secuencias con identidad conocida se encuentra en las Figura 6. La gran mayoría de los transcritos identificados, con la notoria excepción de *mt2* (Cu:His 100 μ M *mt+* y *mt-*, Tabla 3, Material Anexo), no son blancos reconocidos de Mtf-1. De un total de 25 secuencias, los transcritos asociados a las categorías de “Crecimiento y Mantenimiento celular” (32%) y “Respuesta a estímulos” (28%), resultaron ser los mayoritarios para la dosis de Cu:His 50 μ M en la línea silvestre (Figura 6, panel C). En particular, 6 genes vinculados a la respuesta a estrés térmico representan casi la cuarta parte del total de transcritos inducidos en respuesta a este exceso de cobre. En la línea mutante, el 40% de los 16 transcritos detectados con Cu:His 50 μ M no cuenta con un proceso biológico descrito en la base de datos de Gene Ontology (Figura 6, panel D). 4 genes asociados a transducción

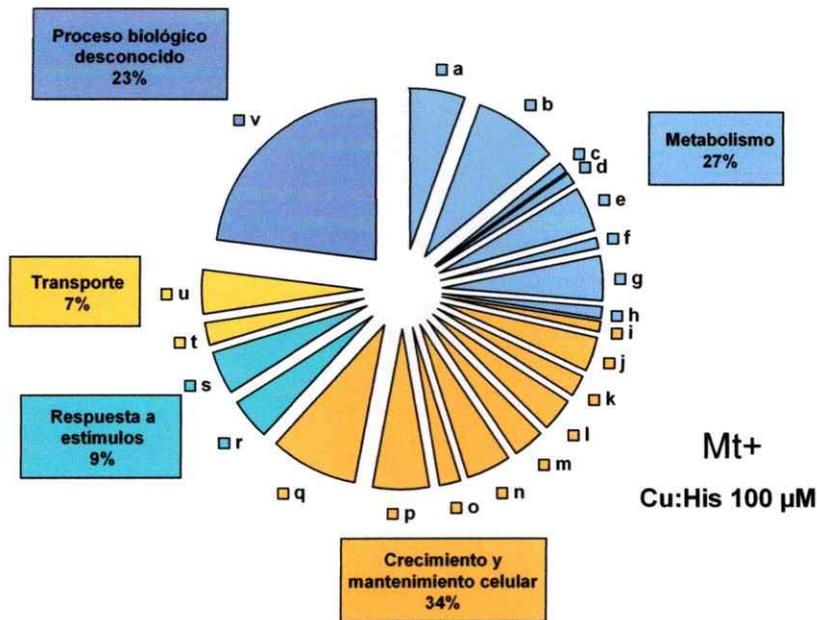
de señales representan la segunda mayoría, un 27% del total de transcritos. A diferencia de la línea silvestre, no fueron detectados aquí genes ligados a la respuesta a estrés térmico. En la línea silvestre, la dosis de Cu:His 100 μ M involucró principalmente a las categorías de “Crecimiento y Mantenimiento celular” (33%) y “Metabolismo” (29%), que incluyen procesos como biosíntesis de proteínas, catabolismo de proteínas y transducción de señales (Figura 6, panel A). Nuevamente se encontró un número similar de transcritos relacionados con estrés térmico (q, 5 genes) y plegamiento de proteínas (ñ, 1 gen). En la línea mutante (Figura 6, Panel B), las categorías y subcategorías más representadas también fueron las de “Crecimiento y Mantenimiento celular” (29%) y “Metabolismo” (25%). Pese a la aparente similitud en los procesos involucrados en la respuesta al exceso de cobre en ambas líneas celulares, el análisis particular de los genes inducidos en uno y otro tipo celular arrojó solo 22 genes en común de un total de 102 en la línea *mt+* y 132 en la línea *mt-* (Material Anexo, Tabla 3). Por otra parte, la comparación de las secuencias detectadas con 50 y 100 μ M en la línea silvestre permitió identificar 5 transcritos cuya abundancia aumentó frente a ambos tratamientos: *hsp105*, *hsp90aa1*, *hspa1a*, *hspa8* y *nat8l*. Los cuatro primeros codifican para proteínas de estrés térmico, mientras que el último posiblemente codifica para una acetil transferasa. El mismo análisis en la línea mutante arrojó como resultado la ausencia de transcritos en común entre ambos tratamientos. Lo robusto de los patrones de abundancia de los genes de estrés térmico en la línea silvestre me llevó a reorganizar la información en una forma alternativa a Gene Ontology e identificar, en un análisis bibliográfico combinado con los resultados de esta base de datos, transcritos relacionados con el metabolismo de metales y el estrés térmico y otros pertenecientes a mecanismos tangencialmente vinculados

tales como la respuesta a estrés oxidativo y el ciclo de ubiquitinación. En consecuencia, los transcritos relevantes fueron clasificados en 3 grupos: a) metabolismo de metales y estrés oxidativo, b) estrés térmico y c) ubiquitinación. La Figura 7 detalla entonces aquellos transcritos detectados en los experimentos de microarreglos cuya abundancia aumentó significativamente incluidos en estas 3 categorías. Los resultados indican marcadas diferencias entre líneas celulares respecto al patrón de cambio en la abundancia de los transcritos analizados: como regla general, el número de transcritos que presentan una variación positiva en las condiciones estudiadas, cuando los hay, es siempre mayor en la línea silvestre, pese a que el total de genes involucrados es levemente mayor en la línea mutante (102 contra 132, respectivamente). Otro punto interesante es que el número de transcritos encontrados frente a Cu:His 50 μ M es ostensiblemente menor a los identificados en los cultivos mantenidos con 100 μ M de Cu:His en ambas líneas celulares. Esta tendencia es especialmente marcada en la línea mutante, donde la dosis de Cu:His 50 μ M no presenta ningún cambio de abundancia respecto al control en los tres grupos de genes analizados. En la línea silvestre, en cambio, el grueso de la respuesta frente a 50 μ M está representado por genes de estrés térmico, en desmedro de las categorías de “Metabolismo de metales” y “Ubiquitinación”. Cabe destacar además que los transcritos en común entre una y otra línea son siempre escasos, lo que sugiere que la respuesta transcripcional a cobre podría diferir en su regulación entre ambos tipos celulares.

	<i>mt+</i> Cu:His 50 μ M	<i>mt+</i> Cu:His 100 μ M	<i>mt-</i> Cu:His 50 μ M	<i>mt-</i> Cu:His 100 μ M
Identificados	25	91	16	112
No identificados	0	11	0	20
Total	25	102	16	132

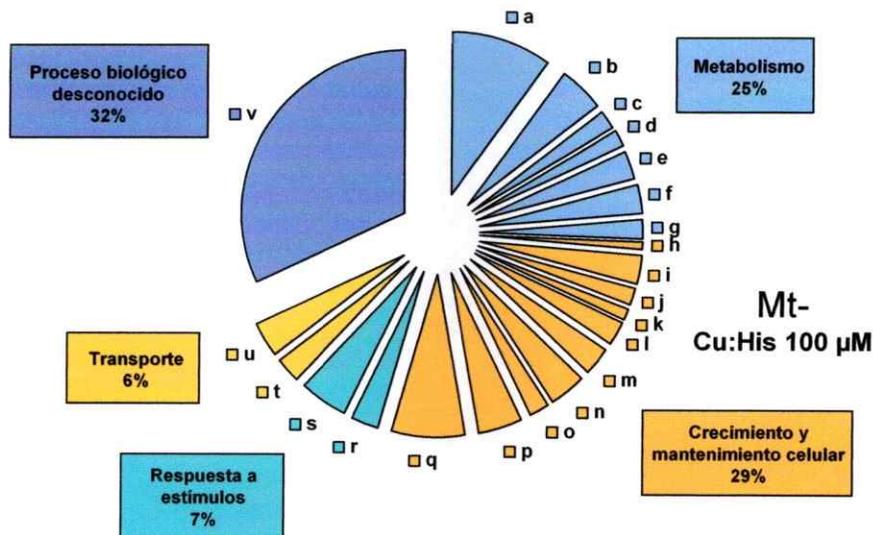
Tabla 2. Número de transcritos identificados en los análisis de microarreglos. La tabla detalla el número de secuencias con y sin identificación asociada cuya abundancia aumentó en las hibridaciones de microarreglos, realizadas con RNAs provenientes de fibroblastos *mt+* y *mt-* expuestos a durante 48 horas a 50 y 100 μ M de Cu:His.

(A)

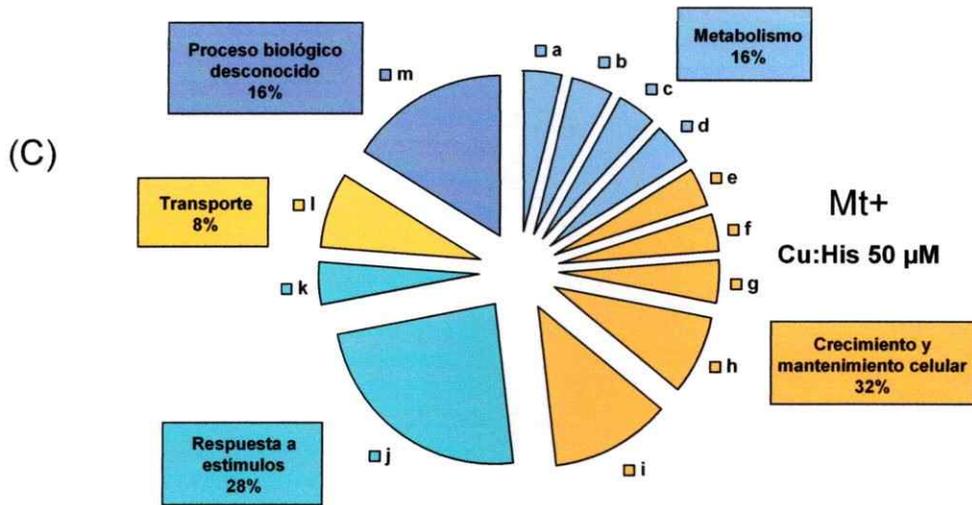


- a - biosíntesis de proteínas - 5%
- b - catabolismo de proteínas - 8%
- c - metabolismo de aminoácidos - 1%
- d - metabolismo de DNA - 1%
- e - metabolismo de lípidos - 4%
- f - metabolismo de nucleótidos - 1%
- g - metabolismo de RNA - 4%
- h - modificación de proteínas - 1%
- i - adhesión celular - 1%
- j - ciclo celular - 3%
- k - homeostasis de cationes 2%
- l - morfogénesis y diferenciación celular - 3%
- m - organización y biogénesis cromosomal - 3%
- n - organización y biogénesis del citoesqueleto - 4%
- ñ - plegamiento de proteínas - 2%
- o - regulación de la transcripción - 5%
- p - transducción de señales - 8%
- q - estrés térmico - 4%
- r - respuesta a otros estímulos - 4%
- t - transporte de cationes metálicos - 2%
- u - transporte de otras moléculas - 4%
- v - no clasificados - 23%

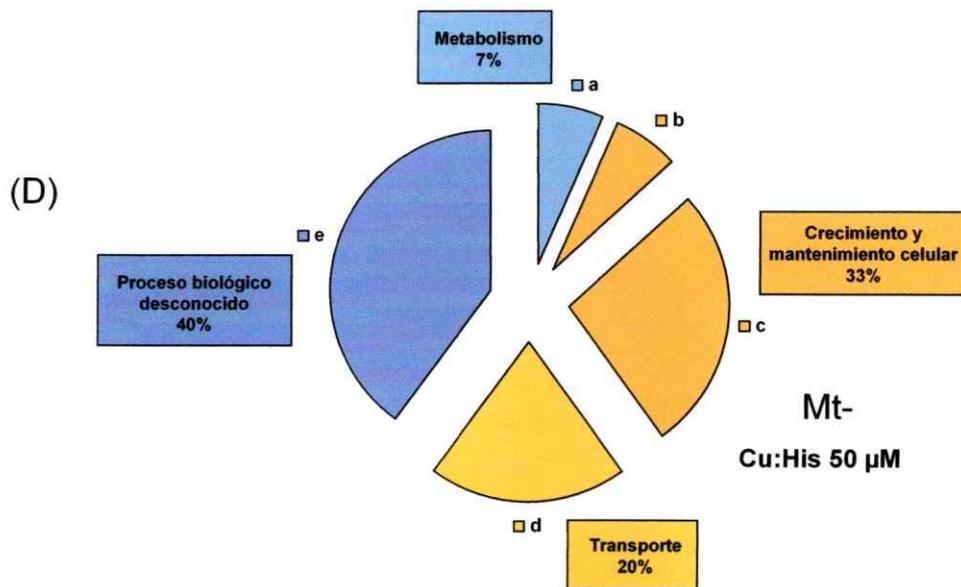
(B)



- a - biosíntesis de proteínas - 10%
- b - catabolismo de proteínas - 5%
- c - metabolismo de aminoácidos - 2%
- d - metabolismo de DNA - 2%
- e - metabolismo de nucleótidos - 3%
- f - metabolismo de RNA - 3%
- g - modificación de proteínas - 2%
- h - adhesión celular - 1%
- i - apoptosis - 3%
- j - ciclo celular - 2%
- k - homeostasis de cationes - 1%
- l - morfogénesis y diferenciación celular - 3%
- m - organización y biogénesis cromosomal - 3%
- n - organización y biogénesis del citoesqueleto - 4%
- ñ - plegamiento de proteínas - 2%
- o - regulación de la transcripción - 5%
- p - transducción de señales - 7%
- q - estrés térmico - 3%
- r - respuesta a otros estímulos - 5%
- s - transporte de proteínas - 3%
- t - transporte de otras moléculas - 4%
- v - no clasificados - 32%



- a - biosíntesis de proteínas - 4%
- b - catabolismo de proteínas - 4%
- c - metabolismo de lípidos - 4%
- d - metabolismo de pigmentos - 4%
- e - adhesión celular - 4%
- f - ciclo celular - 4%
- g - morfogénesis y diferenciación celular - 4%
- h - regulación de la transcripción - 8%
- i - transducción de señales - 12%
- j - estrés térmico - 24%
- k - respuesta a otros estímulos - 4%
- l - transporte - 8%
- m - no clasificados - 16%



- a - biosíntesis de proteínas - 7%
- b - adhesión celular - 7%
- c - transducción de señales - 27%
- d - transporte - 20%
- e - no clasificados - 40%

Figura 6. Clasificación funcional de los genes identificados por microarreglos. Los genes inducidos con 100 y 50 μM de Cu:His en las líneas *mt+* (A, C) y *mt-* (B, D) fueron categorizados de a través de la base de datos de Gene Ontology (http://www.informatics.jax.org/searches/GO_form.shtml) según el proceso biológico asociado y agrupados en las categorías de Metabolismo, Crecimiento y mantenimiento celular, Transporte, Respuesta a estímulo y Proceso biológico desconocido.

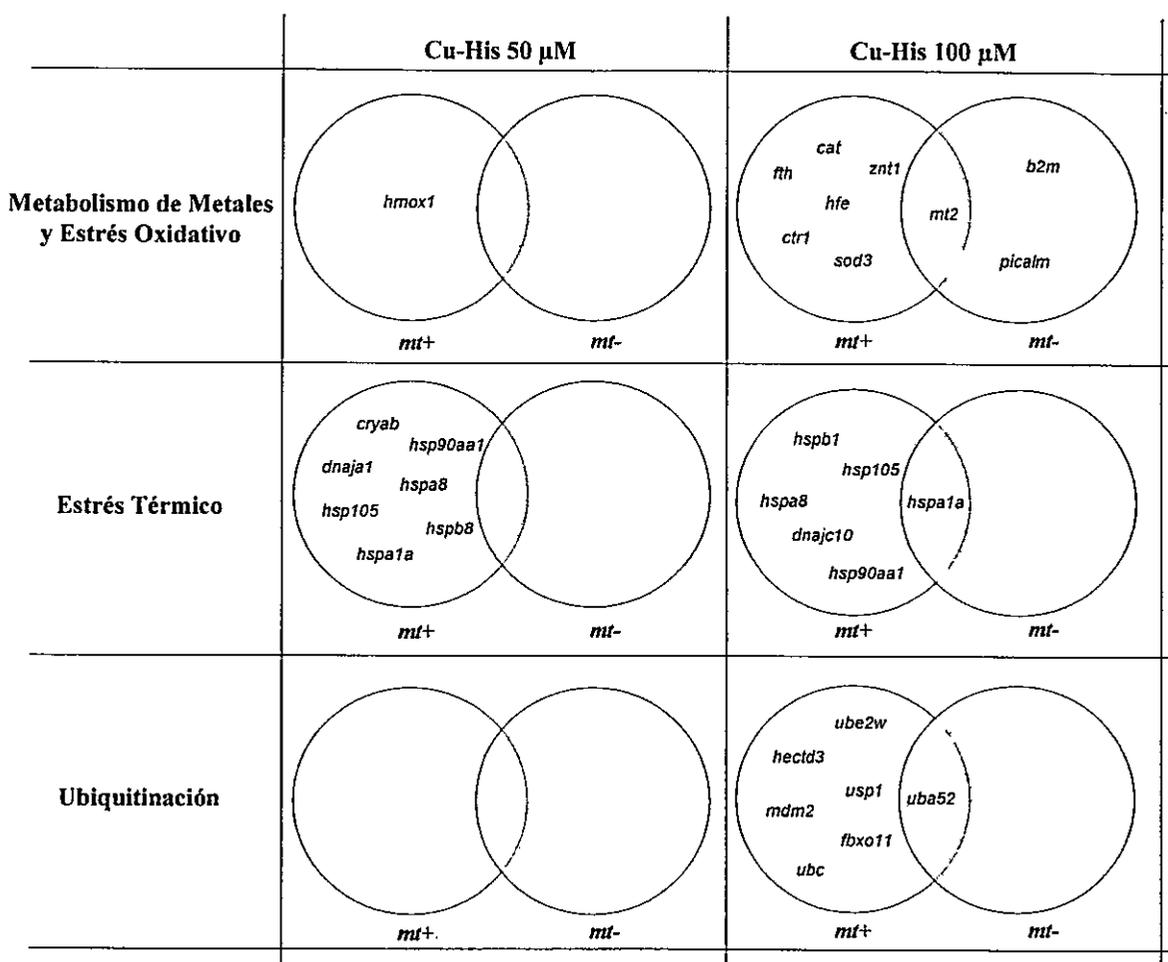


Figura 7. Genes asociados a mecanismos de protección celular. Los genes inducidos con las dosis de Cu:His 50 y 100 μ M fueron asociados a mecanismos de protección celular frente a un exceso de cobre fueron clasificados dentro de las categorías de Metabolismo de metales y estrés oxidativo, Estrés térmico y Ubiquitinación. Las leyendas *mt+* y *mt-* identifican a los transcritos correspondientes a la línea silvestre y mutante, respectivamente.

DISCUSIÓN

1. Características de la metodología empleada

En el desarrollo de esta tesis resultó fundamental el modelo celular de fibroblastos murinos mutantes y silvestres para las metalotioneínas 1 y 2, creado por Palmiter y col. en 1996. Ambas líneas celulares han sido utilizadas en una serie de trabajos experimentales que persiguen definir la función de estas proteínas. Cabe señalar, sin embargo, que el carácter indiferenciado de estas líneas celulares hace plausible la presencia de Mt3 y Mt4, propias, respectivamente, de tejido neuronal y escamoso y descritas como pobremente inducibles (Tapiero y Tew, 2003). Esta posibilidad permanece a la fecha sin descartar, y dado que se desconoce el grado de similitud o divergencia en las funciones de la familia de las Mt, constituye un factor a considerar a la hora de interpretar los resultados de este trabajo y sus precedentes.

El registro de la viabilidad indicó la existencia de diferencias significativas en los valores de MTT entre controles y células tratadas con cobre para ambas líneas celulares, diferencias que no fueron detectadas por el método del azul tripán. Cabe la posibilidad de que esta discordancia tenga su origen en una menor sensibilidad del conteo con azul tripán o bien en la alteración de la actividad mitocondrial a raíz de los tratamientos suministrados, lo que incidiría en la cuantificación del ensayo de MTT. En efecto, el cobre ha sido descrito como un inhibidor de la actividad deshidrogenasa mitocondrial en células de neuroblastoma humano (Arciello y col, 2005). Teniendo esto en mente, la visión conciliatoria de los datos recolectados a través de ambas metodologías apunta a que los efectos del cobre en la viabilidad de las líneas celulares empleadas son pocos o

ninguno, lo que por lo menos permite asegurar que pese a que el suministro de cobre están muy por sobre los niveles fisiológicos, los resultados de este estudio parecen reflejar la respuesta fisiológica de células no especializadas en el manejo de cobre a un desafío dentro del rango de control homeostático, y no la exposición a un elemento altamente citotóxico.

El conocimiento acumulado a la fecha describe que, cuando el cobre se encuentra disponible en cantidades que exceden los requerimientos fisiológicos, la respuesta adaptativa establecida por la célula tiene como consecuencia el incremento de la abundancia de transcritos vinculados al almacenamiento y transporte del metal y el manejo del daño oxidativo, sin que exista una disminución de transcritos relacionados con procesos como el ingreso de cobre (Tennant y col, 2002; Tapia y col, 2004) . Es por ello que en el presente trabajo se decidió, como una primera aproximación para sopesar la influencia de metalotioneína, identificar qué genes presentaban un alza ante una sobre oferta de cobre en una línea celular silvestre y otra mutante para Mt y qué diferencias existían entre ellas, sin que ello fuera en desmedro de la posible importancia biológica de aquellos transcritos que sufren un detrimento en las mencionadas condiciones. El empleo de la técnica de microarreglos permite el monitoreo simultáneo de los cambios en la abundancia de un gran número de transcritos (cerca de 11000 en este estudio), lo que supone la posibilidad de generar una enorme cantidad de información con relativa facilidad. No obstante, frecuentemente se ha acusado a esta metodología de ser altamente dependiente una serie de variables, tales como la elección de la técnica de marcación de las sondas, las condiciones de hibridación y el análisis estadístico de los datos, todos factores que podrían hacer los resultados poco reproducibles y que ponen en

cuestionamiento el trasfondo biológico de los datos obtenidos. Tanto las hibridaciones como los respectivos análisis estadísticos cuyos resultados aquí se describen fueron realizados como una colaboración externa a nuestro laboratorio, por medio de condiciones y filtros sumamente estrictos que, en desmedro del número de genes encontrados, permiten reducir drásticamente la cantidad de falsos positivos asociados a experimentos de esta naturaleza (Randolph y Waggoner, 1997; Hughes y col, 2001; Loguinov y col, 2004). Es necesario señalar también que esta metodología solo permite tener una imagen indirecta del comportamiento transcripcional, dado que la abundancia de un determinado transcrito también puede estar influida por factores como la estabilidad del mensajero o la tasa de degradación. La ausencia de réplicas biológicas y las limitaciones de la técnica obligan a considerar los resultados descritos como una base para estudios posteriores donde se profundicen diferencias particulares del comportamiento transcripcional de las líneas celulares *mt+* y *mt-* a través de otras metodologías y diseños experimentales.

2. Clasificación funcional de los genes identificados

Los distintos transcritos que generaron una señal de hibridación significativamente diferente del resto para las condiciones analizadas fueron clasificados a través de la base de datos de *Gene Ontology*, con el propósito de describir el conjunto de genes involucrado en la adaptación al exceso de cobre de acuerdo a las funciones biológicas asociadas a cada uno de ellos. En cada condición estudiada, parte importante de los transcritos (16 - 40%) resultó no tener un proceso biológico asignado en la base de datos. La gran mayoría de los genes fue rotulado en las clasificaciones de

“Crecimiento y mantenimiento celular” y “Metabolismo”, que, entre otros, incluían a genes ligados a la biosíntesis y metabolismo de proteína, regulación de la transcripción y transducción de señales. Ello sugiere la participación en el proceso de adaptación a un exceso de cobre de una serie de elementos que, hasta donde es posible deducir de la anotación del genoma de ratón, no están vinculados de manera obvia con la homeostasis del metal. En efecto, de todos los transcritos detectados, el estado del arte únicamente permite considerar a *mt2* (cuya inducción fue observada bajo la dosis de Cu:His 100 μ M tanto en los fibroblastos *mt+* como en los *mt-*) como un posible blanco del factor transcripción Mtf-1. En este sentido, la respuesta transcripcional de ambas líneas celulares puede parecer similar en términos de la proporción de los elementos involucrados en cada una de las categorías asignadas, salvo la notoria excepción de la ausencia de transcritos relacionados con respuesta a estímulos en la lista Cu:His 50 μ M para la línea mutante. Sin embargo, las diferencias individuales en la identidad de los transcritos detectados en una y otra línea fueron mucho mayores que lo que podría sugerirse a primera vista desde los gráficos que resumen su clasificación funcional. La naturaleza de las divergencias observadas en el comportamiento transcripcional de los fibroblastos *mt+* y *mt-*, así como su relación con los parámetros fisiológicos analizados en el presente trabajo, serán discutidas en mayor profundidad en los siguientes párrafos.

3. Proliferación y viabilidad en fibroblastos *mt+* y *mt-*

La tasa de proliferación de las líneas *mt+* y *mt-*, determinada por el conteo de células por tinción de azul tripán (Figura 1) presentó valores equivalentes en ambos tipos celulares. A pesar de las aparentes discrepancias en los ensayos de viabilidad generados

por la tinción con azul tripán y el ensayo de MTT, discutidas en el punto 1, las observaciones efectuadas a través de estos métodos concordaron en que no existen diferencias entre la resistencia de los fibroblastos silvestres y mutantes a las distintas dosis de cobre suministradas. Tal como queda señalado en Tapia y col, 2004, la distinción en la resistencia al exceso de cobre entre las líneas *mt+* y *mt-* es demasiado sutil para ser explicada en términos de viabilidad, y solo queda en evidencia al ser presentada en función del contenido intracelular del metal. Es por ello que la imposibilidad de distinguir el genotipo mutante a través del fenotipo de la resistencia a cobre no era en absoluto inesperada. Cabe destacar además que un resultado colateral del proceso de la clasificación funcional, de acuerdo a la base de datos de Gene Ontology, de los transcritos detectados en las distintas condiciones de exposición a cobre fue el encuentro de una marcada diferencia en el número de genes relacionados con procesos apoptóticos inducidos con Cu:His 100 μ M entre fibroblastos silvestres y mutantes: 3 transcritos en los fibroblastos *mt-* (Figura 6, panel B, categoría i) y ninguno en los fibroblastos *mt+* (Figura 6, panel B). Ello está en concordancia con estudios que indican que el desplazamiento del equilibrio del sistema apoptótico hacia la muerte celular frente a condiciones de toxicidad es más acentuado en ausencia de metalotioneína (Kondo y col, 1997; Jia y col, 2004).

4. Metabolismo de cobre y zinc

La concentración intracelular de cobre, hierro y zinc en condiciones normales de cultivo resultó ser independiente de la presencia de Mt. El nivel intracelular de estos tres metales no difirió entre líneas celulares, lo que sugiere que frente a la disponibilidad

sub-fisiológica de metales traza en el medio de cultivo, otras proteínas distintas a Mt tales como enzimas, chaperonas o transportadores conforman los principales receptáculos de cobre y zinc al interior de la célula, o bien que los fibroblastos mutantes son capaces de suplir la carencia de metalotioneína a través de otras moléculas, como glutatión, que les permiten mantener los niveles de cobre y zinc dentro de los mismos rangos que la línea silvestre. El incremento de 1,5 veces en el contenido intracelular de cobre observado frente a la exposición a Cu:His 100 μ M en los fibroblastos *mt+* (significativo de acuerdo a la prueba de T, $p < 0,05$) no tuvo paralelo en la línea *mt-*, donde la dosis de cobre suministrada no alteró la cuantificación de la abundancia intracelular del metal. Ello hace evidente la necesidad de contar con Mt para conformar una fuente de almacenamiento de cobre frente a una sobre oferta en la disponibilidad de este elemento. El aumento en la abundancia del transcrito de *mt2*, cuya inducción concomitante con un alza en el contenido interno de cobre ha sido reportada en una serie de trabajos previos (Arredondo y col, 2004; Irato y Albergoni, 2005; Tokuda y col, 2007), resultó ser común para ambas líneas celulares. Es interesante que, pese a que el contenido de cobre de la línea mutante no se vio sujeto a variaciones, sí se haya registrado un incremento en *mt2*. Ello podría sugerir que el gen de metalotioneína 2 no respondió en esta línea a las fluctuaciones en la abundancia interna del metal, si no a otros factores tales como el exceso en su disponibilidad o el estrés oxidativo que podría arrastrar la exacerbada abundancia de cobre (Palmiter, 1998; Colangelo y col, 2004), o bien, que la regulación transcripcional de este gen se encuentra alterada en las células *mt-*. Esta última interpretación encuentra apoyo en un reporte reciente que describe modificaciones en la migración de Mtf-1, factor de transcripción que dirige la activación

de *mt2*, en fibroblastos de pulmón de ratones mutantes para las metalotioneínas 1 y 2 (Stitt y col, 2006).

Reportes previos han descrito la expresión del transcrito de *ctr1*, el transportador de entrada de alta afinidad para cobre, como invariante o inducible en condiciones de exceso del metal dependiendo del modelo de estudio utilizado: mientras que en células Caco-2 una sobrecarga de cobre no tuvo ningún efecto sobre la cuantificación del transcrito de *ctr1* (Tennant y col, 2002), el grupo de Bauerly y col registró un aumento en los niveles de mRNA de *ctr1* en hígado de ratas infantiles suplementadas oralmente con dosis elevadas del metal (2004). El alza en la abundancia de este transcrito, detectada en el presente trabajo sólo en los fibroblastos *mt+*, es congruente con la observación de que la tasa de entrada de cobre se ve disminuida en la línea *mt-* (Tapia y col, 2004), y además de reforzar la importancia de la presencia de metalotioneína para conformar una fuente de reserva segura para el exceso de cobre, plantea interesantes interrogantes acerca de su vínculo con la regulación transcripcional de *ctr1*. Cabe también destacar que, pese a que no se detectaron alteraciones en los niveles de zinc en ninguno de los tipos celulares expuestos a cobre, sí se registró en la línea silvestre expuesta a Cu:His 100 μ M un aumento en la abundancia de *znt4*, quien hace las veces de transportador de salida de zinc (Palmiter y Huang, 2004).

5. Metabolismo de hierro

Hierro y zinc, a diferencia del cobre, presentaron una tendencia similar en ambos tipos celulares cultivados en presencia de Cu:His 100 ó 50 μ M: el primero sufrió un detrimento que en la línea silvestre estuvo en el rango de 1,8 a 2,2 veces, y en la

mutante, entre 2,5 y 3,5 veces. Pese a la aparente mayor magnitud de la disminución registrada en las células *mt-*, el análisis estadístico no arrojó diferencias en los niveles de hierro cuantificados en una u otra línea frente a una misma condición. La baja de el contenido de hierro ante la exposición a cobre ha sido previamente descrita para una serie de líneas celulares tales como los mismos fibroblastos *mt+* (Tapia y col, 2003), HepG2 (Tapia y col, 2003; Arredondo y col, 2004) y Caco2 (Tennant y col, 2002; Tapia y col, 2003). El grupo de Tennant y col. reportó además una disminución en la entrada de hierro acompañada de un aumento en su tasa de salida para células Caco-2 en presencia de un exceso de cobre. Una explicación para este fenómeno radica en una posible competencia entre cobre y hierro por la entrada a la célula a través del transportador Dmt1, el que es capaz de ingresar tanto uno como otro elemento (Arredondo y col, 2003). Alternativamente, cabe señalar que experimentos *in vitro* sugieren que el cobre disminuye la capacidad de la proteína IRP-1 de unirse a RNA y favorece su actividad aconitasa (Oshiro y col, 2002). Esta proteína es la encargada de regular, junto a su homólogo IRP-2, ya sea la traducción o degradación de distintos transcritos ligados al metabolismo de hierro (Rouault, 2006), según se una a secuencias palindrómicas afines denominadas IRE que pueden estar presentes en sus extremos no traducidos 5' ó 3'. El exceso de cobre suministrado a los fibroblastos *mt+* y *mt-* podría entonces también inhibir la interacción de las IRPs con el IRE 5' UTR de el transportador de salida de hierro ferroportina, lo que incidiría en una tasa más acelerada de traducción del transcrito correspondiente y el consiguiente aumento en la salida del metal. La cadena pesada de la transferrina (*fth*) y el gen de la proteína de la hemocromatosis (*hfe*) son otros dos transcritos vinculados al metabolismo de hierro cuya

abundancia aumentó únicamente en la línea silvestre, mientras que beta 2 microglobulina (*b2m*) y el transcrito de la proteína de unión a fosfatidilinositol de ensamblaje de clatrina (*picalm*) lo hicieron exclusivamente en la línea mutante. La ferritina es una proteína conformada por 24 subunidades en una proporción variable de cadenas pesadas (Fth) y livianas (Ftl), y constituye la principal molécula encargada del almacenamiento de hierro al interior de la célula (Wang y col, 2006). La presencia de elementos IRE en el 5' UTR de este gen permite suponer un aumento en la abundancia del péptido correspondiente, mas no necesariamente del transcrito. El cómo es regulada la transcripción del gen *fth* frente al exceso de cobre en la línea *mt+*, y en qué difiere esta regulación de la establecida en los fibroblastos *mt-* es una pregunta que merece un estudio más acabado. Similar es el caso de *hfe* (*mt+* Cu:His 100 μ M), *b2m* y *picalm* (*mt-* Cu:His 100 μ M), cuyas funciones en el metabolismo de hierro no han sido del todo precisadas. Mutaciones en el gen de la proteína Picalm la han identificado como un componente del proceso de hematopoiesis (Klebig y col, 2003). La proteína de la hemocromatosis (Hfe) se asocia con Beta-2-Microglobulina (B2m) y podría tener un efecto negativo sobre la absorción de hierro mediante la interacción con el receptor de transferrina (Ikuta y col, 2000; Miranda y col, 2004).

6. Expresión génica, estrés oxidativo, estrés térmico y ubiquitinación

El aumento en la abundancia de *sod3* y *cat*, cuyos productos génicos catalizan reacciones de neutralización de especies oxidantes (Due y col, 2006; Kirkman y Gaetani, 2007), fue observado únicamente con la dosis de Cu:His 100 μ M en la línea *mt+*. También resultó ser el caso de la proteína la cadena pesada de la transferrina (*fth*,

Cu:His 100) y la hem-oxigenasa 1 (*hmx1*, Cu:His 50 μ M), quienes también han sido vinculadas a la defensa contra el estrés oxidativo (Tsuji y col, 2000; Kruger y col, 2006). La ausencia de marcadores de esta naturaleza en la línea *mt-* admite varias interpretaciones, entre ellas, que los fibroblastos podrían encontrarse menos estresados que su contraparte silvestre en las condiciones estudiadas. Alternativamente, cabe la posibilidad de que sean incapaces de detectar el estrés que implica el exceso de cobre suministrado, o estén inhabilitados para establecer una respuesta transcripcional a modo de defensa. Una tercera explicación radica en que la pérdida de metalotioneína podría correlacionarse con un aumento en los niveles basales de estrés oxidativo, por lo que los transcritos de este tipo podrían encontrarse permanentemente inducidos. Se ha descrito que los átomos de cisteína que en la metalotioneína permiten la unión de iones metálicos contribuyen a la captura de radicales libres mediante la oxidación de los correspondientes grupos sulfuro (Palmiter y col, 1998, Colangelo y col, 2004). La cuantificación de la abundancia de especies radicales libres o del daño oxidativo generado en los fibroblastos *mt+* y *mt-* puede arrojar respuestas que permitan explicar las diferencias observadas en su comportamiento transcripcional. Algunas proteínas de estrés térmico también han sido vinculadas a la defensa ante el estrés oxidativo (Preville y col, 1999; Selsby y Dodd, 2005; Broome y col, 2006), y resulta curioso que el número de transcritos de este tipo detectados en la línea silvestre con ambas dosis de cobre nuevamente haya sido mayor a los encontrados en la línea mutante. Las Hsps (*heat shock proteins*) están además involucradas en la corrección y prevención del plegamiento anómalo de proteínas, que podría ser el efecto del exceso de un agente oxidante como es el cobre (Dalle-Donne y col, 2006; Routias y Tzioufas, 2006). Por ello

no resulta extraño que su inducción haya sido reportada en una serie de trabajos que analizan el proceso de adaptación a la sobrecarga de metales (Jimenez y col, 2002; Urani y col, 2003; Southon y col, 2004; Tapia y col, 2004). La transcripción de los genes de estrés térmico es regulada mediante el factor de transcripción Hsf-1, y recientemente se ha descrito la interacción de éste con Mtf-1, el que, como ya se mencionó, presenta un patrón de migración anómalo al núcleo celular en ausencia de Mt (Stitt y col, 2006). Ello plantea un posible escenario que podría explicar el cómo la pérdida de metalotioneína podría repercutir en la respuesta transcripcional de otros genes no vinculados directamente al metabolismo de metales, que no obstante sí guardan relación con mecanismos generales de protección celular. El paralelo observado en el patrón de expresión de los genes ligados a estrés oxidativo y estrés térmico también se repitió en aquellos genes asociados al ciclo de ubiquitinación, los que nuevamente resultaron presentes en menor número en la línea *mt-*. El sistema de ubiquitinación constituye la principal vía de degradación proteica en la célula, y cumple con la función de catabolizar aquellas proteínas que presentan plegamientos anómalos no corregidos. Es así como el proceso de ubiquitinación tiene un papel complementario a la actividad chaperona que desempeñan las Hsps. El control de este sistema ha sido descrito como principalmente post-traducciona (Gao y Karin, 2005). El gen de la ubiquitina de pollo, sin embargo, contiene en su promotor dos elementos HSE y su expresión es inducida rápida y transitoriamente por el estrés térmico (Bond y Schlesinger, 1986). En conjunto, estos resultados apuntan a diferencias en el comportamiento transcripcional de los fibroblastos *mt+* y *mt-* que podrían estar explicadas por la alteración en el “estrés celular” provocado

por la ausencia de metalotioneína, o por las posibles interacciones que esta proteína puede sostener con diferentes vías de regulación transcripcional (como Mtf-1 y/o Hsf-1).

CONCLUSIONES

La ausencia de las metalotioneínas 1 y 2 no alteró los niveles de cobre, hierro y zinc, ni tampoco la tasa proliferación de los fibroblastos mutantes en condiciones normales de cultivo. La viabilidad de la línea celular *mt-* tampoco se vio afectada por la carencia de Mt en las condiciones estudiadas. La presencia de metalotioneína sí resultó ser determinante a la hora de regular el contenido interno de cobre frente a un exceso en la disponibilidad del metal en los rangos de concentración suministrados, dado que, a diferencia de lo ocurrido en los fibroblastos silvestres, en la línea mutante la exposición a cobre no desencadenó un aumento en su abundancia intracelular. Sí fue común para ambas líneas cultivadas en presencia de cobre la disminución en el contenido de hierro, lo que es evidencia de una posible superposición en la regulación metabólica de ambos nutrientes.

La generación de muestras de RNA de fibroblastos *mt+* y *mt-* tratados con cobre permitió generar un perfil del comportamiento transcripcional de ambas líneas celulares ante concentraciones suprafisiológicas del metal. La adaptación a cobre parece involucrar tanto en fibroblastos *mt+* y *mt-* una serie de elementos que no están directamente vinculados con la maquinaria homeostática del metal, y que están en su mayoría representados en la transducción de señales y el metabolismo de proteínas. Sin embargo, se detectaron diferencias notorias entre ambas líneas en los patrones de abundancia de transcritos relacionados con el metabolismo de cobre, hierro y zinc, además de otros también asociados al estrés oxidativo, el estrés térmico, la ubiquitinación y la apoptosis. Estos resultados apuntan a posibles alteraciones en la

capacidad de manejar situaciones de estrés y regular la transcripción de una serie de genes vinculados a mecanismos de protección celular en ausencia de metalotioneína.

BIBLIOGRAFÍA

Arciello M., Rotilio G., Rossi L. 2005. Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327 (2): 454-459.

Armendariz A., Olivares F., Pulgar R., Loguinov A., Cambiazo V., Vulpe C., González M. 2006. Gene expression profiling in wild-type and metallothionein mutant fibroblast cell lines. *Biol. Res.* 39 (1): 125-142.

Arredondo M., Cambiazo V., Tapia L., González-Agüero M., Nuñez M., Uauy R., González M. 2004. Copper overload affects copper and iron metabolism in Hep-G2 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 287 (1): G27-G32.

Arredondo M., Muñoz P., Mura C., Nuñez M. 2003. DMT1, a physiologically relevant apical Cu¹⁺ transporter of intestinal cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 284 (6): C1525-C1530.

Ashburner M., Ball C., Blake J., Botstein D., Butler H., Cherry J., Davis A., Dolinski K., Dwight S., Eppig J., Harris M., Hill D., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J., Richardson J., Ringwald M., Rubin G., Sherlock G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25 (1): 25-29.

Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J., Struhl K. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition.* John Wiley and Sons Editions.

Bauerly K., Kelleher S., Lonnerdal B. 2005. Effects of copper supplementation on copper absorption, tissue distribution, and copper transporter expression in an infant rat model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 288 (5): G1007-G1014.

Bond U., Schlesinger M. 1986. The chicken ubiquitin gene contains a heat shock promoter and expresses an unstable mRNA in heat-shocked cells. *Mol. Cell. Biol.* 6 (12): 4602-4610.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Broome C., Kayani A., Palomero J., Dillmann W., Mestril R., Jackson M., McArdle A. 2006. Effect of lifelong overexpression of HSP70 in skeletal muscle on age-related oxidative stress and adaptation after nondamaging contractile activity. *FASEB J.* 20 (9): 1549-51.

Cano-Gauci D., Sarkar B. 1996. Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger. *FEBS Lett.* 386: 1-4.

Colangelo D., Mahboobi H., Viarengo A., Osella D. 2004. Protective effects of metallothioneins against oxidative stress evaluated on wild type and MT-null cell lines by means of flow cytometry. *Biometals.* 17: 365-370.

Cole S. 1986. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 17 (3): 259-263.

Coyle P., Philcox J., Carey L., Rofe A. 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci.* 59 (4): 627-47.

Dalle-Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R., Milzani A. 2006. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* 10 (2): 389-406.

Due A., Petersen S., Valnickova Z., Ostergaard L., Oury T., Crapo J., Enghild J. 2006. Extracellular superoxide dismutase exists as an octamer. *FEBS Lett.* 580 (5): 1485-9.

Gao M., Karin M. 2005. Regulating the regulators: control of protein ubiquitination and ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli. *Mol. Cell.* 19 (5): 581-593.

González M., Tapia L., Alvarado M., Tornero J., Fernández R. 1999. Intracellular determination of elements in mammalian cultured cells by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (5): 885-888.

Hughes T., Mao M., Jones A., Burchard J., Marton M., Shannon K., Lefkowitz S., Ziman M., Schelter J., Meyer M., Kobayashi S., Davis C., Dai H., He Y., Stephanians S., Cavet G., Walker W., West A., Coffey E., Shoemaker D., Stoughton R., Blanchard A., Friend S., Linsley P. 2001. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat. Biotechnol.* 19: 342-347.

Ikuta K., Fujimoto Y., Suzuki Y., Tanaka K., Saito H., Ohhira M., Sasaki K., Kohgo Y. 2000. Overexpression of hemochromatosis protein, HFE, alters transferrin recycling process in human hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1496 (2-3): 221-31.

Irato P., Albergoni V. 2005. Interaction between copper and zinc in metal accumulation in rats with particular reference to the synthesis of induced-metallothionein. *Chem. Biol. Interact.* 155 (3): 155-64.

Jia G., Gu Y., Chen K., Lu Y., Yan L., Wang J., Su Y., Wu J. 2004. Protective role of metallothionein (I/II) against pathological damage and apoptosis induced by dimethylarsinic acid. *World J. Gastroenterol.* 10 (1): 91-95.

Jimenez I., Aracena P., Letelier M., Navarro P., Speisky H. 2002. Chronic exposure of HepG2 cells to excess copper results in depletion of glutathione and induction of metallothionein. *Toxicol. In Vitro.* 16 (2):167-175.

Kelly E., Palmiter R. 1996. A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nat. Genet.* 13: 219-222.

Kirkman H., Gaetani G. 2007. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem. Sci.* 32 (1): 44-50.

Klebig M., Wall M., Potter M., Rowe E., Carpenter D., Rinchik E. 2003. Mutations in the clathrin-assembly gene *Picalm* are responsible for the hematopoietic and iron metabolism abnormalities in *fit1* mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (14): 8360-8365.

Kondo Y., Rusnak J., Hoyt D., Settineri C., Pitt B., Lazo J. 1997. Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol. Pharmacol.* 52 (2): 195-201.

Kruger A., Peterson S., Schwartzman M., Fusco H., McClung J., Weiss M., Shenouda S., Goodman A., Goligorsky M., Kappas A., Abraham N. 2006. Up-regulation of heme oxygenase provides vascular protection in an animal model of diabetes through its antioxidant and antiapoptotic effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319 (3) :1144-1452.

Levin E., Perraut C., Pollard N., Freedman J. 2006. Metallothionein expression and neurocognitive function in mice. *Physiol. Behav.* 87 (3): 513-518.

Lichtlen P., Wang Y., Belser T., Georgiev O., Certa U., Sack R., Schaffner W. 2001. Target gene search for the metal-responsive transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res.* 29 (7): 1514-23.

Linder, M., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R., Lomeli, N., 1998. Copper transport. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 965S-971S.

Loguinov A., Mian I., Vulpe C. 2004. Exploratory differential gene expression analysis in microarray experiments with no or limited replication. *Genome Biol.* 5(3): R18.

Masters B., Kelly E., Quaife C., Brinster R., Palmiter R. 1994. Targeted disruption of metallothionein I and II genes induces sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (2): 584-588.

McArdle H., Erlich R. 1991. Copper uptake and transfer to the mouse fetus during pregnancy. *J. Nutr.* 121 (2): 208-214.

- Miranda C., Makui H., Andrews N., Santos M. 2004. Contributions of beta2-microglobulin-dependent molecules and lymphocytes to iron regulation: insights from HfeRag1(-/-) and beta2mRag1(-/-) double knock-out mice. *Blood*. 103 (7): 2847-2849.
- Natale J., Knight J., Cheng Y., Rome J., Gallo V. 2004. Metallothionein I and II mitigate age-dependent secondary brain injury. *J. Neurosci. Res.* 78 (3): 303-314.
- Oshiro S., Nozawa K., Hori M., Zhang C., Hashimoto Y., Kitajima S., Kawamura K. 2002. Modulation of iron regulatory protein-1 by various metals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (1): 213-8.
- Palmiter R. 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 95 (15): 8428-30.
- Palmiter R., Huang L. 2004. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch.* 447 (5): 744-51.
- Preville X., Salvemini F., Giraud S., Chaufour S., Paul C., Stepien G., Ursini M., Arrigo A. 1999. Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. *Exp. Cell. Res.* 247: 61-78.
- Puig S., Thiele D. 2002. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.*; 6 (2): 171-180.
- Rae T., Schmidt P., Pufahl R., Culotta V., O'Halloran T. 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*. 284 (5415): 805-808.
- Randolph J., Waggoner A. 1997. Stability, specificity and fluorescence brightness of multiply-labeled fluorescent DNA probes. *Nucleic Acids Res.* 25 (14): 2923-2929.
- Roesijadi G., Bogumil R., Vasak M., Kagi J. 1998. Modulation of DNA binding of a tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein conjugate pair. *J. Biol. Chem.* 273: 17425-17432.
- Rouault T. 2006. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol.* 2 (8): 406-14.
- Routsias J., Tzioufas A. 2006. The role of chaperone proteins in autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1088: 52-64.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Selsby J., Dodd S. 2005. Heat treatment reduces oxidative stress and protects muscle mass during immobilization. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289 (1): R134-R139.
- Southon A., Burke R., Norgate M., Batterham P., Camakaris J. 2004. Copper homeostasis in *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Biochem. J.* 383 (Pt 2): 303-309.
- Stankovic R. 2005. Atrophy of large myelinated axons in metallothionein-I, II knockout mice. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25 (5): 943-953.
- Stitt M., Wasserloos K., Tang X., Liu X., Pitt B., St Croix C. 2006. Nitric oxide-induced nuclear translocation of the metal responsive transcription factor, MTF-1 is mediated by zinc release from metallothionein. *Vascul. Pharmacol.* 44 (3): 149-55.
- Sugiura T., Kuroda E., Yamashita U. 2004. Dysfunction of macrophages in metallothionein-knock out mice. *J. UOEH.* 26 (2): 193-205.
- Tapia L., González Agüero M., Cisternas M., Suazo M., Cambiazo V., Uauy R., González M. 2004. Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels. *Biochem J.* 378 (Pt 2): 617-624.
- Tapia L., Suazo M., Hödar C., Cambiazo V., Gonzalez M. 2003. Copper exposure modifies the content and distribution of trace metals in mammalian cultured cells. *Biometals.* 16: 169-174.
- Tapiero H., Tew K. 2003. Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and Metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.* 57 (9): 399-411.
- Tennant J., Stansfield M., Yamaji S., Srail S., Sharp P. 2002. Effects of copper on the expression of metal transporters in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.* 527 (1-3): 239-44.
- Tokuda E., Ono S., Ishige K., Naganuma A., Ito Y., Suzuki T. 2007. Metallothionein proteins expression, copper and zinc concentrations, and lipid peroxidation level in a rodent model for amyotrophic lateral sclerosis. *Toxicology.* 229 (1-2): 33-41.
- Tsuji Y., Ayaki H., Whitman S., Morrow C., Torti S., Torti F. 2000. Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 20 (16): 5818-27.
- Uauy R., Olivares M., Gonzalez M. 1998. Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clinical Nutrition.* 67: 952S-959S.

Urani C., Calini V., Melchiorretto P., Morazzoni F., Canevali C., Camatini M. 2003. Different induction of metallothioneins and Hsp70 and presence of the membrane transporter ZnT-1 in HepG2 cells exposed to copper and zinc. *Toxicol. In Vitro.* 17 (5-6): 553-559.

Waalkes M., Liu J., Kasprzak K., Diwan B. 2006. Hypersusceptibility to cisplatin carcinogenicity in metallothionein-I/II double knockout mice: production of hepatocellular carcinoma at clinically relevant doses. *Int. J. Cancer.* 119 (1): 28-32.

Wang Z., Li C., Ellenburg M., Soistman E., Ruble J., Wright B., Ho J., Carter D. 2006. Structure of human ferritin L chain. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62 (Pt 7): 800-806.

Wesselkamper S., McDowell S., Medvedovic M., Dalton T., Deshmukh H., Sartor M., Case L., Henning L., Borchers M., Tomlinson C., Prows D., Leikauf G. 2006. The role of metallothionein in the pathogenesis of acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 34 (1): 73-82.

Yoshida M., Satoh M., Shimada A., Yasutake A., Sumi Y., Tohyama C. 1999. Pulmonary toxicity caused by acute exposure to mercury vapor is enhanced in metallothionein-null mice. *Life Sci.* 64 (20): 1861-1867.

Zeng J., Heuchel R., Schaffner W., Kagi J. 1991a. Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1. *FEBS Lett.* 279 (2): 310-312.

Zeng J., Vallee B., Kagi J. 1991b. Zinc finger from transcription factor transcription factor IIIA fingers to thionein clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 (22): 9984-9988.

Zhang B., Georgiev O., Hagmann M., Gunes C., Cramer M., Faller P., Vasak M., Schaffner W. 2003. Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* 23 (23): 8471-8485.

MATERIAL ANEXO

Tabla 1. Genes regulados positivamente en fibroblastos mt+ tratados con 50 μ M de Cu-His

Código Genebank	Nombre del Gen	Símbolo
AI845657	basic transcription element binding protein 1 (Bteb1)	<i>bteb1</i>
AI847296	chimerin (chimaerin) 1 (Chn1)	<i>chn1</i>
AI836919	crystallin, alpha B	<i>cryab</i>
AI837235	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	<i>dnaja1</i>
AI841957	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 6	<i>gabrab6</i>
AI847904	golgi SNAP receptor complex member 2	<i>gosr2</i>
AI854396	glutamate receptor, metabotropic 5	<i>grm5</i>
AI842171	heme oxygenase (decycling) 1	<i>hmox1</i>
AI845946	heat shock protein 105	<i>hsp105</i>
AI841289	heat shock protein 1 ^a	<i>hspa1a</i>
AI836986	heat shock protein 8	<i>hspa8</i>
AI848798	heat shock 27kDa protein 8	<i>hspb8</i>
AI839932	heat shock protein 1, alpha	<i>hspca</i>
AI836893	laminin receptor 1 (ribosomal protein SA)	<i>lamr1</i>
AI847083	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	<i>pp1cb</i>
AI854286	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6C (Sema6c)	<i>sema6c</i>
AI847675	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8	<i>slc22a8</i>
AI847805	secreted phosphoprotein 1	<i>spp1</i>
AI853605	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	<i>sptlc2</i>
AI841579	zinc finger, AN1-type domain 2A (Zfand2a)	<i>zfand2a</i>
AI844684	zinc finger, A20 domain containing 2	<i>zfp216</i>

Tabla 2. Genes regulados positivamente en fibroblastos mt- tratados con 50 μ M de Cu-His

Código Genebank	Nombre del Gen	Símbolo
AI850823	Burkitt lymphoma receptor 1	<i>blr1</i>
AI836376	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 4 (S. cerevisiae)	<i>dcun1d4</i>
AI837469	Discs, large homolog-associated protein 4 (Drosophila) (Dlgap4)	<i>dlgap4</i>
AI852085	G-protein signalling modulator 2 (AGS3-like, C. elegans)	<i>gpsm2</i>
AI854564	Potassium channel, subfamily K, member 4	<i>kcnk4</i>
AI837759	megakaryocyte-associated tyrosine kinase	<i>matk</i>
AI848120	Neurocalcin delta (Ncald)	<i>ncald</i>
AI852319	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	<i>pdgfra</i>
AI847690	ribosomal protein S4, X-linked	<i>rps4x</i>
AI848157	Slc43a2 mRNA for L-type amino acid transporter 4	<i>slc43a2</i>
AI851662	Zinc finger and BTB domain containing 7 (Zbtb7)	<i>zbtb7</i>

Tabla 3. Genes regulados positivamente en fibroblastos mt+ y mt- tratados con 100 μ M de Cu-His

Código Genbank	Nombre del Gen	Símbolo
AI852678	adenomatosis polyposis coli	<i>apc</i>
AI837758	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2	<i>capza2</i>
AI840191	solute carrier family 44, member 1	<i>cdw92</i>
AI839363	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6	<i>eif3s6</i>
AI843263	eukaryotic translation initiation factor 5	<i>eif5</i>
AI846927	FBJ osteosarcoma oncogene B	<i>fosb</i>
AI846799	H3 histone, family 3A	<i>h3f3a</i>
AI844131	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	<i>hnrrpa2b1</i>
AI841289	heat shock protein 1 ^a	<i>hspa1a</i>
AI850268	methionine adenosyltransferase II, alpha	<i>mat2a</i>
AI850620	matrin 3	<i>matr3</i>
AI480893	metallothionein 2	<i>mt2</i>
AI846930	progesterone receptor membrane component 1	<i>pgrmc1</i>
AI843656	protein kinase C, delta	<i>prkcd</i>
AI838689	protein tyrosine phosphatase 4a2	<i>ptp4a2</i>
AI837314	RAB7, member RAS oncogene family	<i>rab7</i>
AI839993	scavenger receptor class B, member 2	<i>scarb2</i>
AI840197	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	<i>sparc</i>
AI836012	t-complex-associated-testis-expressed 1-like	<i>tcte11</i>
AI838607	thrombospondin 1	<i>thbs1</i>
AI847817	tight junction protein 1	<i>tjp1</i>
AI841699	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	<i>uba52</i>

Tabla 4. Genes regulados positivamente solo en fibroblastos mt+ tratados con 100 μ M de Cu-His

Código Genebank	Nombre del Gen	Símbolo
AI844698	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2	<i>abca2</i>
AI854771	Angiomotin	<i>amot</i>
AI838490	amyloid beta (A4) precursor-like protein 1	<i>aplp1</i>
AI852478	Apolipoprotein C-III	<i>apoc3</i>
AI839327	activating transcription factor 7 interacting protein	<i>atf7ip</i>
AI835672	ATPase type 13A2	<i>atp13a2</i>
AI527414	Catalase	<i>cat</i>
AI850707	Checkpoint with forkhead and ring finger domains	<i>chfr</i>
AI839184	Cold shock domain containing E1, RNA binding	<i>csde1</i>
AI853067	Casein kinase 1, alpha 1	<i>csnka1</i>
AI845673	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	<i>dnajb6</i>
AI838060	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10	<i>dnajc10</i>
AI837696	erythrocyte protein band 4.1-like 2	<i>epb4.1l2</i>
AI844751	Eukaryotic translation termination factor 1	<i>etf1</i>
AI854803	F-box protein 11	<i>fbxo11</i>
AI196520	ferritin heavy chain	<i>fth</i>
AI835756	Dendritic cell protein GA17	<i>ga17</i>
AI85269	Growth hormone inducible transmembrane protein	<i>ghitm</i>
AI836554	high density lipoprotein (HDL) binding protein	<i>hdlbp</i>
AI850616	HECT domain containing 3	<i>hectd3</i>
AA265447	hemochromatosis	<i>hfe</i>
AI851595	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	<i>hnrpa3</i>
AI852336	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	<i>hnrpab</i>
AI838486	heat shock protein 105	<i>hsp105</i>
AI841358	heat shock protein 8	<i>hspa8</i>
W30103	Heat shock protein 1	<i>hspb1</i>
AI836122	heat shock protein 1, alpha	<i>hspca</i>
AI851942	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 2	<i>kbtbd2</i>
AI847525	kinesin family member 5B	<i>kif5b</i>
AI836002	La ribonucleoprotein domain family, member 5	<i>larp5</i>
AI840212	leukocyte receptor cluster (LRC) member 5	<i>leng5</i>
AI853375	transformed mouse 3T3 cell double minute 2	<i>mdm2</i>
AI851412	microorchidia 2A	<i>morc2a</i>
AI839417	moesin	<i>msn</i>
AI842649	myosin, light polypeptide 9, regulatory	<i>myl9</i>
AI847067	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4 (Nedd4)	<i>nedd4</i>

AI847531	Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, beta1 subunit (Pafah1b1)	<i>pafah1b1</i>
AI847890	proteolipid protein (myelin)	<i>plp1</i>
AI847455	RAB10, member RAS oncogene family	<i>rab10</i>
AI853224	Retinoic acid induced 14	<i>rai14</i>
AI851276	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	<i>ramp2</i>
AI850275	Rap2 interacting protein (Rap2ip)	<i>rap2ip</i>
AI849453	arginyl-tRNA synthetase	<i>rars</i>
AI834788	REST corepressor 3	<i>rcor3</i>
AI853438	RecQ protein-like	<i>recql</i>
AI839936	ring finger protein 13	<i>rnf13</i>
AI851214	ribosomal L1 domain containing 1	<i>rsl1d1</i>
AI842025	RUN and FYVE domain containing 3	<i>rufy3</i>
AI854671	SET translocation	<i>set</i>
AI849566	SET domain containing (lysine methyltransferase) 8	<i>setd8</i>
AI846980	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 4 (Znt4)	<i>slc30a4</i>
AI854432	Solute carrier family 31, member 1 (Ctr1)	<i>slc31a1</i>
AI843695	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3	<i>slc37a3</i>
AI317380	superoxide dismutase 3, extracellular	<i>sod3</i>
AI834833	Transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1	<i>tbl1xr1</i>
AI840549	Ubiquitin C	<i>ubc</i>
AI845633	ubiquitin-conjugating enzyme E2W (putative)	<i>ube2w</i>
AI848382	ubiquitin specific peptdiase 1	<i>usp1</i>
AI839048	Vesicular inhibitory amino acid transporter (Viaat)	<i>viaat</i>
AI840802	5'-3' exoribonuclease 2	<i>xrn2</i>
AI836699	zinc finger, A20 domain containing 2	<i>za20d2</i>
AI852047	zinc finger, CCHC domain containing 6	<i>zcchc6</i>

Tabla 5. Genes regulados positivamente solo en fibroblastos mt- tratados con 100 μ M de Cu-His

Código Genebank	Nombre del Gen	Símbolo
AI836191	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	<i>abcc5</i>
AI845042	annexin A5	<i>anxa5</i>
AI837594	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1	<i>atp5f1</i>
AI848681	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2	<i>atp6ap2</i>
AI848245	beta-2 microglobulin	<i>b2m</i>
AI853900	CD302 antigen	<i>cd302</i>
AI844682	cell division cycle 42 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>cdc42</i>
AI854022	Pp36	<i>cdv3</i>
AI847251	casein kinase I, alpha 1	<i>csnk1a1</i>
AI841451	cut-like 1 (<i>Drosophila</i>), transcript variant 2	<i>cull1</i>
AI847355	Cytochrome c, somatic	<i>cycs</i>
AI839184	Cold shock domain containing E1, RNA binding	<i>d3Jfr1</i>
AI837235	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	<i>dnaja1</i>
AI834803	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 12	<i>dnajb12</i>
AI843267	Dedicator of cytokinesis 7	<i>dock7</i>
AI843451	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	<i>eef1a1</i>
AI851493	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)	<i>eif2s2</i>
AI836099	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 2	<i>eif4g2</i>
AI849475	enhancer of polycomb homolog 1 (<i>Drosophila</i>), transcript variant 1	<i>epc1</i>
AI854256	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10	<i>galnt10</i>
AI847926	golgi apparatus protein 1	<i>glg1</i>
AI847544	GPI-anchored membrane protein 1	<i>gpiap1</i>
AI841981	hepatitis B virus x interacting protein	<i>hbxiip</i>
AI838001	Hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus) domain and RCC1 (CHC1)-like domain (RLD) 1	<i>herc1</i>
AI836129	high mobility group nucleosomal binding domain 2	<i>hmgn2</i>
AI843558	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Hnrpk)	<i>hnrpk</i>
AI848331	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	<i>hnrpu</i>
AI838039	heat shock protein 1 (chaperonin)	<i>hspd1</i>
AI847614	LIM domain binding 2	<i>ldb2</i>
AI840134	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	<i>marcks</i>
AI853143	mortality factor 4 like 1	<i>morf4l1</i>
AI853257	mitochondrial ribosomal protein S33	<i>mrps33</i>
AI841664	nucleosome assembly protein 1-like 1	<i>nap1l1</i>
AI847934	neurofilament, light polypeptide	<i>nefl</i>
AI841804	expressed in non-metastatic cells 1, protein	<i>nme1</i>

AI848144	neuron specific gene family member 2	<i>nsg2</i>
AI838078	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 9	<i>nudt9</i>
AI838261	origin recognition complex, subunit 5-like (S. cerevisiae)	<i>orc5l</i>
AI848346	polyadenylate-binding protein-interacting protein 2	<i>paip2</i>
AI852884	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein (Picalm)	<i>picalm</i>
AI838874	Protein phosphatase 2a, catalytic subunit, beta isoform	<i>ppp2cb</i>
AI842458	glutamine and serine rich 1	<i>qser1</i>
AI838463	RAS related protein 1b	<i>rap1b</i>
AI847923	regulator of G-protein signaling 2	<i>rgs2</i>
AI849041	Ras-like without CAAX 2	<i>rit2</i>
AI845529	ribonuclease P 40 subunit (human)	<i>rnasep1</i>
AI851588	Ribosomal protein L23	<i>rpl23</i>
AI834863	ribosomal protein L26	<i>rpl26</i>
AI841501	ribosomal protein S3a	<i>rps3a</i>
AI844168	reticulon 4 receptor	<i>rtn4r</i>
AI853842	RWD domain containing 1	<i>rwdl1</i>
AI850227	SECIS binding protein 2	<i>secisbp2</i>
W41702	solute carrier family 35, member B1	<i>slc35b1</i>
AI845086	smu-1 suppressor of mec-8 and unc-52 homolog (C. elegans)	<i>smul</i>
AI845078	CDC42 small effector 1	<i>specl</i>
AI840676	spectrin beta 2	<i>spnb2</i>
AI845051	spectrin beta 3	<i>spnb3</i>
AI847805	secreted phosphoprotein 1	<i>spp1</i>
AI844250	Single stranded DNA binding protein 4	<i>ssbp4</i>
AI846244	Suppression of tumorigenicity 13	<i>st13</i>
AI848364	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (yeast)	<i>sumo1</i>
AI837760	Arylformamidase (Afmid)	<i>syng2</i>
AI843287	Tax1 (human T-cell leukemia virus type 1) binding protein 1	<i>tax1bp1</i>
AI849958	transducin (beta)-like 3	<i>tbl3</i>
AI851197	transcription factor 4	<i>tcf4</i>
AI854679	tumor differentially expressed 2 (serine incorporator 1)	<i>tde2</i>
AI849063	transforming growth factor beta 1 induced transcript 4	<i>tgfb1i4</i>
AI853152	thymopoietin	<i>tmpo</i>
AI840048	target of myb1 homolog (chicken)	<i>tom1</i>
AI844401	tumor protein D52	<i>tpd52</i>
AI845961	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	<i>ube2l3</i>
AI835432	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide	<i>ywhab</i>
AI835456	Zinc finger CCCH type containing 11A	<i>zc3h11a</i>
AI847909	zinc finger, CSL-type containing 3	<i>zcs13</i>
AI844866	zinc finger, A20 domain containing 2	<i>zfp216</i>