

UCH-FC
Biotecnología
P981
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



**ESTUDIO DEL EFECTO DEL COBRE SOBRE LAS REDES TRANSCRIPCIONALES
DE GENES VINCULADOS AL METABOLISMO DE METALES EN HepG2**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

Rodrigo Enrique Pulgar Tejo

Diciembre, 2006
Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Mauricio González Canales.
Co-Director de Memoria de Título: Dr. Miguel Arredondo Olgún.

Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica.
INTA – Universidad de Chile.



“ESTUDIO DEL EFECTO DEL COBRE SOBRE LAS REDES TRANSCRIPCIONALES DE GENES VINCULADOS AL METABOLISMO DE METALES EN HepG2”

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

RODRIGO ENRIQUE PULGAR TEJO

Directores Seminario de Título

Dr. Mauricio González Canales

Mauricio González Canales

Dr. Miguel Arredondo Olgún

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Marco Tulio Núñez

Marco Tulio Núñez

Presidente Comisión

Dr. Nicolás Guiliani
Corrector

Nicolás Guiliani

Santiago de Chile, 21 de octubre de 2006.

A mis padres, Ximena y Pedro,

a mi hija Francisca.

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer a muchas personas por el desarrollo de esta tesis. En primer lugar a mi familia, principalmente a mis padres y a mi hija por permitirme ocupar gran parte de nuestro tiempo en mi trabajo de laboratorio. A mi tutor, Dr. Mauricio González Canales por la confianza depositada en aquel entonces "joven estudiante de pregrado" y en aquellos momentos donde las cosas no salían como esperábamos, por todo el tiempo de trabajo en conjunto, por sus críticas y por enseñarme a interpretar datos que al inicio parecían no decir mucho, agradezco también su interés en mi formación científica de una manera rigurosa pero cordial. A mi co-tutor, Dr. Miguel Arredondo Olguín quien fue muy importante en la parte inicial de este proyecto y por su siempre buena disposición de enseñarme aspectos fundamentales del metabolismo de hierro. A la Dra. Verónica Cambiaso por aceptarme en su laboratorio, por sus consejos y por enseñarme a trabajar ordenada y críticamente. Agradezco especialmente a Miriam Suazo por enseñarme del metabolismo de Cu, de las técnicas necesarias para su estudio, por nuestras conversaciones y principalmente por ser una gran persona. A mi querido amigo Felipe Olivares por ser mi socio en el camino, por su compañía, paciencia y por todo lo que he aprendido de él, muchas gracias Felipe. Agradezco también a mis compañeros y amigos, los "tatitas" del laboratorio, Lucho, Chodar, Jano, MGA, Angélica R. y Talía del Pozo, por los errores que cometieron antes que yo y por aquellos que me enseñaron ☺, por la compañía y por el tiempo dedicado. Agradezco a mis amigos de la "nueva generación", Igor, Freddy, Leo y Pata con quienes hemos compartido muy gratos momentos y de seguro los seguiremos compartiendo, también a los novatos Angélica G. y Mauricio L,. Agradezco al Dr. Marcos Méndez por su ayuda y compañía, también a la gente del laboratorio de biología celular y del laboratorio de microminerales del INTA, en especial a Paula y Angélica quienes me ayudaron mucho. Finalmente agradezco al Dr. Nicolás Guillani y al Dr. Marco Tulio Núñez por el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis y por los consejos sugeridos. Gracias a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
1. El cobre, un nutriente esencial.....	1
2. Proteínas que participan en el metabolismo celular de Cu en mamíferos.....	2
3. Factores que regulan la expresión de genes que codifican para proteínas responsables del metabolismo de cobre: La metalotioneína, una proteína modelo.....	3
4. Interacción entre el metabolismo de Cu, Fe y Zn.....	5
5. Utilización de hibridación en matrices (arrays) para análisis de expresión génica.....	6
6. Hipótesis.....	8
7. Objetivo general.....	8
8. Objetivos específicos.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
1. MATERIALES.....	10
1.1. Líneas celulares.....	10
1.2. Células procariontes.....	10
1.3. Vectores.....	10

1.4. Partidores.....	13
1.5. Anticuerpos.....	14
1.6. Sales y reactivos.....	14
2. MÉTODOS.....	14
2.1. Cultivo celular.....	14
2.1.1. Manejo de líneas celulares en cultivo.	14
2.1.2. Almacenamiento de las líneas celulares.	15
2.1.3. Tratamientos con Cu:His o DFO.....	15
2.2. Determinación del estado de parámetros celulares.....	16
2.2.1. Cuantificación del contenido intracelular de metales traza.....	16
2.2.2. Cuantificación de proteínas.....	16
2.2.3. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).	17
2.2.4. Cuantificación de la fluorescencia asociada a MT.....	17
2.2.5. Cuantificación de la viabilidad celular.....	18
2.2.6. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	18
2.3. Procedimientos de biología molecular.....	19
2.3.1. Electroforesis.....	19
2.3.2. Cuantificación de DNA y RNA.....	19
2.3.3. Mantenimiento de cultivos bacterianos.....	20
2.3.4. Extracción de DNA plasmidial.....	20
2.3.5. Extracción de RNA total y purificación de mRNA.....	21
2.3.6. Transcripción <i>in vitro</i> de <i>dap</i>	22
2.3.7. Síntesis de cDNAs no radioactivos.....	23
2.3.8. PCR Cuantitativo en tiempo real (q-RT PCR).....	23
2.4. Construcción de la genoteca.....	24
2.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	24
2.4.2. Ligación.....	24

2.4.3. Transformación bacteriana.....	25
2.4.4. Selección de transformantes.....	25
2.4.5. Análisis de la presencia de insertos en los clones.....	25
2.5. Hibridación en membranas de nylon.....	26
2.5.1. Características de las membranas.....	26
2.5.2. Marcación de sondas.....	27
2.5.3. Hibridación con sondas radioactivas.....	28
2.6. Análisis de datos.....	28
2.6.1. Obtención de imágenes.....	28
2.6.2. Obtención de datos, análisis de calidad de la señal de hibridación y normalización.....	29
2.7. Bases de datos, herramientas bioinformáticas y análisis estadístico.....	30
 RESULTADOS.....	 31
1. Determinación del contenido intracelular de metales y de la viabilidad celular en células HepG2 y Caco-2 expuestas a una concentración supra-fisiológica de Cu	33
1.1. Medición del contenido intracelular de cobre, hierro y zinc.....	33
1.2. Análisis de la viabilidad celular.....	36
2. Efecto del suplemento de Cu:His o DFO sobre células HepG2.....	37
2.1. Análisis del contenido de metales.....	37
2.2. Determinación de la acumulación de ROS y de la viabilidad celular.....	41
2.3. Determinación de la abundancia relativa del transcrito <i>mt</i> y de la proteína metalotioneína (MT) en células HepG2.....	43
3. Efecto del suplemento de Cu:His o DFO sobre células Caco-2.....	46
3.1. Análisis del contenido de metales.....	46

3.2. Determinación de la acumulación de ROS y de la viabilidad celular.....	49
3.3. Determinación de la abundancia relativa del transcrito <i>mt</i> y de la proteína metalotioneína (MT) en células Caco-2.....	51
4. Construcción y caracterización de una librería de cDNAs vinculados al metabolismo de Cu, Fe, Zn y defensa contra daño oxidativo en humanos.....	54
4.1. Construcción de la librería.....	54
4.2. Verificación de secuencias clonadas.....	57
5. Expresión de genes involucrados en el metabolismo de Cu, Fe, Zn y defensa contra el daño oxidativo en células HepG2 expuestos a Cu:His o DFO.....	60
5.1. Producción de las matrices de hibridación.....	60
5.2. Evaluación de la calidad de los RNAs y producción de sondas complejas de hibridación.....	61
5.3. Obtención de datos y análisis de calidad de la señal de hibridación.....	65
5.4. Procedimiento de normalización de datos de expresión génica en ensayos de hibridación.....	70
6. Análisis de expresión génica.....	72
6.1. Genes diferencialmente expresados en células HepG2 tratadas con Cu:His...72	
6.2. Genes diferencialmente expresados en células HepG2 tratadas con DFO.....75	
7. Validación de datos de expresión génica y diferencias tipo celular – específicas.....	78
DISCUSIÓN.....	80
1. Características de la metodología utilizada.....	80
2. Contenido de metales.....	82
3. Producción de ROS, viabilidad celular y citoprotección vía MT.....	85

4. Análisis de expresión génica.....	87
CONCLUSIONES.....	98
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de clones que forman parte de la librería de cDNAs vinculados al metabolismo de metales y defensa contra el daño oxidativo.....	12
Tabla 2. Partidores utilizados en la amplificación de fragmentos de PCR.....	13
Tabla 3. Relaciones de abundancia entre metales en células HepG2.....	40
Tabla 4. Relaciones de abundancia entre metales en células Caco-2.....	48
Tabla 5. Características de los genes seleccionados para análisis de expresión génica...56	
Tabla 6. Transcritos cuya abundancia cambia significativamente entre células HepG2 no tratadas y tratadas con Cu:His.....	74
Tabla 7. Transcritos cuya abundancia cambia significativamente entre células HepG2 no tratadas y tratadas con DFO.....	77
Tabla 8. Validación de cambios de expresión de algunos genes ensayados por macroarrays.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los tratamientos con Cu:His o DFO en células HepG2.....	32
Figura 2. Medición del contenido intracelular de Cu, Fe y Zn en células HepG2 y Caco-2 expuestas a Cu:His.	35
Figura 3. Determinación de la viabilidad celular en células HepG2 y Caco-2 expuestas a Cu:His.....	36
Figura 4. Medición del contenido intracelular de Cu, Fe y Zn en células HepG2 no expuestas o expuestas a Cu:His o DFO.....	38
Figura 5. Determinación de la acumulación de ROS y de la viabilidad en células HepG2 expuestas a Cu:His o DFO.....	42
Figura 6. Determinación de la abundancia relativa del transcrito (<i>mt</i>) y de la proteína metalotioneína (MT) en células HepG2 expuestas a Cu:His o DFO.	45
Figura 7. Medición del contenido intracelular de Cu, Fe y Zn en células Caco-2 no expuestas o expuestas a Cu:His o DFO.....	47
Figura 8. Determinación de la acumulación de ROS y de la viabilidad en células Caco-2 expuestas a Cu:His o DFO.....	50
Figura 9. Determinación de la abundancia relativa del transcrito (<i>mt</i>) y de la proteína metalotioneína (MT) en células Caco-2 expuestas a Cu:His o DFO.....	53
Figura 10. Verificación por análisis de restricción de la identidad de los clones adquiridos comercialmente.	58
Figura 11. Verificación por análisis de restricción de la identidad de los productos clonados.....	59
Figura 12. Amplificación por PCR de fragmentos a sembrar en membranas de nylon.....	59

Figura 13. Índices de calidad de los RNAs extraídos desde células tratadas con Cu:His o DFO utilizados en los ensayos de hibridación	63
Figura 14. Índice de calidad y rendimiento de la purificación del mRNA.....	64
Figura 15. Hibridación en matrices con sondas provenientes de células HepG2 no expuestas o expuestas a Cu:His o DFO.	67
Figura 16. Recuperación de señales de hibridación.....	68
Figura 17. Reproducibilidad entre membranas.....	69
Figura 18. Transcripción <i>in vitro</i> de <i>dap</i> y análisis de la abundancia relativa de transcritos que codifican para <i>actβ</i> o <i>gpdh</i> (posibles normalizadores).....	71
Figura 19. Número de genes diferencialmente expresados en células HepG2 tratadas con Cu:His o DFO.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

Cu:	cobre.
Fe:	hierro.
Zn:	zinc.
Cd:	cadmio.
DNA:	ácido desoxirribonucleico.
RNA:	ácido ribonucleico.
ROS:	especies reactivas de oxígeno.
MRE:	elemento de respuesta a metales.
MT:	metalotioneína.
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa.
HepG2:	línea celular (hepatoblastoma).
Caco-2:	línea celular (adenocarcinoma colorectal)
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero.
cDNA:	ácido desoxirribonucleico complementario.
DFO:	deferoxamina, quelante de hierro.
rpm:	revoluciones por minuto.
Tm:	temperatura de melting.
°C:	grados Celsius.
DMEM:	medio de cultivo celular Eagle modificado por Dulbecco.
SFB:	suero fetal de bovino.
PBS:	buffer fosfato salino.
min:	minutos.
h:	horas.
s:	segundos.
Cu:His:	cobre:histidina.
IFI:	inmunofluorescencia indirecta.

IgG:	inmunoglobulina G.
FITC:	fluoresceína isotiocianato (fluoróforo).
TIFF:	tagged image file format.
H2DCF-DA:	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato H2DCF-DA (fluoróforo).
MTT:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide.
Medio LB:	medio Luria – Bertani.
% v/v:	porcentaje volumen – volumen.
% p/v:	porcentaje peso – volumen.
q-RT PCR:	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo.
U:	unidades enzimáticas.
UV:	ultravioleta.
pb:	pares de bases.
dNTPs:	desoxinucleótidos.
dATP:	desoxiadenina.
dGTP:	desoxiguanina.
dTTP:	desoxitimina.
[³² P] dCTP:	desoxicitosina marcada con el radioisótopo fósforo treinta y dos.
IRE:	elemento de respuesta a hierro.
UTR:	región no traducida.

RESUMEN

El cobre (Cu) es requerido para la función de algunas cuproenzimas, por lo tanto la presencia de este metal es esencial para diferentes funciones fisiológicas. Sin embargo, es capaz de generar radicales libres y oxidar componentes celulares a través de su actividad redox. Estas conflictivas propiedades demandan una fina regulación de los niveles intracelulares de Cu.

Durante este estudio se completó y caracterizó una librería de cDNAs involucrados en el metabolismo de cobre, hierro (Fe), zinc (Zn) y defensa contra el daño oxidativo en humanos, lo que permitió desarrollar un macroarreglo (macroarray) destinado a examinar la expresión de estos genes. Los resultados obtenidos en los ensayos de hibridación en macroarrays indicaron que la exposición a una concentración supra-fisiológica de Cu en células HepG2 incrementó la abundancia de transcritos vinculados a su propio metabolismo, lo cual fue asociado con un aumento del contenido intracelular del metal en función del tiempo de exposición, junto con modificaciones sobre la abundancia de transcritos vinculados al metabolismo de Fe. Similares resultados fueron conseguidos en células expuesta al quelante de Fe, deferoxamina (DFO); sin embargo algunos de los genes que mostraron variaciones en la abundancia de sus transcritos lo hicieron de forma exclusiva para uno u otro tratamiento, lo que se correlacionó con diferencias en las razones de abundancia de metales (Cu/Fe, Cu/Zn y Fe/Zn) entre los tratamientos. La mayoría de los transcritos analizados modificaron su abundancia en células HepG2 expuestas tanto a Cu como a DFO, lo que se correlacionó en la mayoría de los casos con un aumento en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Adicionalmente, los datos generados en esta tesis aportan información relacionada con los efectos del Cu sobre aspectos fisiológicos y moleculares de la célula, mostrando que este metal es capaz de inducir la expresión transcripcional y proteica de la metalotioneína (MT), la que ha sido señalada como fundamental en la resistencia a la

exposición a elevados niveles de Cu y en la regulación transcripcional de algunos genes vinculados a su metabolismo. Las diferencias de abundancia de MT y/o de las razones de contenido de metales entre las líneas celulares HepG2 y Caco-2 pueden dar cuenta de la aparente regulación tipo-celular específica para la transcripción de genes vinculados al metabolismo de metales.

ABSTRACT

Copper is required for the function of several cuproenzymes, therefore the presence of the metal is essential for different physiological functions. However, copper is able to generate free radicals and oxidize cellular component through its redox activity. These conflicting properties demand a close regulation of the intracellular copper level. During this thesis was able to complete and characterize a cDNAs library involved in the metabolism of Cu, Fe, Zn and defense against oxidative damage in human, which made it possible to develop a macroarray destined to examine the expression of these genes. The results obtained in tests of hybridization on macroarrays indicated that the exposure at a supra-physiological concentration of Cu in HepG2 cells increased the abundance of transcripts involved in its own metabolism, which was associated with an increase of the intracellular content of the metal in function on time of exposure, along with modifications on the abundance of transcript involved to metabolism of Fe. Similar results were found in cells exposed to the Fe chelant deferoxamine (DFO); nevertheless some of the genes that showed variations in the abundances of their transcripts did it exclusively for one or the other treatment, which was associated with differences in the abundance metal ratios (Cu/Fe, Cu/Zn y Fe/Zn) between treatments. Most of the analyzed transcripts modified their abundance in cells HepG2 exposed to Cu or to DFO, which was associated in most cases with an increase in the accumulation in oxygen reactive species (ROS).

In addition, the results obtained during this thesis gives information that connect the Cu effects over physiological with molecular mechanism of the cell, showing that this metal is capable of inducing the transcriptional and proteic expression of metallothionein (MT), which has been pointed to be fundamental in the resistance to the exposition at elevated levels of Cu and in the transcriptional regulation of some genes involved in its metabolism. The abundance differences of MT and/or of the metal content ratios between the cellular lines HepG2 and Caco-2 may inform of the apparent specific cellular-type regulation for the transcription of genes involved in the metal metabolism.

INTRODUCCIÓN

1. El cobre, un nutriente esencial.

El Cu es un elemento traza esencial requerido para la vida por todas las especies hasta ahora estudiadas (Tapiero y col., 2001). Su esencialidad está dada por su capacidad para funcionar como un ion intermediario en la transferencia de electrones, pudiendo encontrarse oxidado (Cu^{+2}) o reducido (Cu^{+1}) en los sistemas biológicos. De esta forma, el metal es utilizado como cofactor en importantes reacciones redox de enzimas tales como la citocromo oxidasa (CCO), la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1), la dopamina β -hidroxilasa (DBH), la lisil oxidasa (LO) y la ceruloplasmina (Cp ferroxidasa). Por tal motivo, el Cu resulta clave en procesos de biosíntesis de colágeno y tejido conectivo respiración celular, protección frente a radicales libres, síntesis de neurotransmisores y regulación del metabolismo de Fe (Knight, 1996; Harris, 1995; Vulpe y Packman, 1995).

A pesar de su esencialidad, un exceso de este metal puede dañar severamente a las células. En particular, el Cu puede participar en reacciones tipo Fenton desencadenando la producción de ROS responsables de la peroxidación lipídica en membranas, oxidación directa de proteínas y clivaje de moléculas de DNA y RNA (Halliwell y Gutteridge, 1984). Debido a esta potencial toxicidad, la viabilidad celular depende del balance entre la captación, utilización, acumulación y eliminación del metal. En este balance, la participación de proteínas que unen el metal es fundamental en los mecanismos de transporte y almacenamiento que regulan el contenido intracelular de Cu.

2. Proteínas que participan en el metabolismo celular de Cu en mamíferos.

Los recientes avances en la identificación y caracterización de las proteínas involucradas en el manejo intracelular de Cu permiten visualizar en forma bastante completa la ruta metabólica que da cuenta de la homeostasis de este metal. A continuación se describe en forma resumida el conjunto de proteínas involucradas en el metabolismo de Cu y algunas de sus principales características funcionales.

En mamíferos, se han reportado dos transportadores involucrados en la incorporación intracelular de Cu^{+1} ; CTR1, transportador específico y de alta afinidad por Cu (Zhou y Gitschier, 1997) y DMT1, transportador que se encarga también de la incorporación de otros metales divalentes (Arredondo y col., 2003). Considerando que el Cu plasmático se encuentra como Cu^{+2} y tanto CTR1 como DMT1 lo transportan como Cu^{+1} es necesaria la presencia de sustancias reductoras en la dieta o proteína(s) con actividad cupro-reductasa expuesta(s) al medio extracelular. En mamíferos se ha reportado esta actividad reductasa en al menos dos proteínas de membrana celular, APP (proteína precursora del amiloide) y su homóloga APLP2 (Multhaup y col., 1996). Cuando el Cu ingresa a la célula, el metal es unido a chaperonas de alta afinidad que destinan el Cu intracelular a las proteínas blanco, con una alta eficiencia y especificidad, manteniendo en el medio intracelular una concentración menor a un átomo de Cu por célula (Rae y col., 1999). Esto implica que la activación de las cuproenzimas depende de una interacción proteína – proteína y no del encuentro con átomos en su forma libre. En humanos, las chaperonas descritas son: HAH1 (Atox1), encargada de la transferencia de Cu a ATP7A y ATP7B (proteínas conocidas como Wilson y Menkes, respectivamente); CCS, específica para la SOD1; y Cox17 que es la chaperona que interactúa con la CCO. Todas ellas, junto con las codificadas por sus respectivos ortólogos en levaduras, comparten un dominio de unión al metal altamente conservado mediante el cual coordinan la unión de un átomo de Cu^{+1} (Huffman y O'Halloran, 2001). Por otra parte, el Cu también puede ser unido a glutatión (GSH) o metalotioneínas (MTs), siendo estas últimas proteínas claves para almacenar en forma segura el Cu intracelular (Tapia y col.,

2004). Finalmente, el Cu es eliminado de la célula por medio de transportadores que movilizan el metal desde el citoplasma al lumen de las vesículas de la red trans-Golgi, a través de los transportadores ATP7A (en el epitelio intestinal) o ATP7B (en el tejido hepático). En su paso por el aparato de Golgi, el Cu puede ser incorporado a las diferentes cuproenzimas que se sintetizan en el complejo retículo endoplasmático – aparato de Golgi.

Un aspecto interesante de las proteínas que participan en el metabolismo celular de Cu en mamíferos es que en su gran mayoría los genes que codifican para estas proteínas poseen ortólogos en organismos filogenéticamente muy distantes, incluyendo eucariontes unicelulares como levaduras. Esto no ocurre con los factores de transcripción que regulan la expresión de estos componentes, lo que sugiere que si bien la maquinaria que sustenta el metabolismo del metal ha sido conservada, los mecanismos que regulan la expresión de los genes que codifican para estas proteínas han sufrido fuertes variaciones durante la evolución de los eucariontes.

3. Factores que regulan la expresión de genes que codifican para proteínas responsables del metabolismo de cobre: La metalotioneína, una proteína modelo.

Del análisis de las regiones reguladoras de los genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de Cu, se puede deducir que en eucariontes superiores estos genes presentan una mayor diversidad y número de elementos reguladores al ser comparados con sus ortólogos en levaduras (Murphy y col., 1999; Daffada y Young, 1999). Un elemento *cis* regulador común en mamíferos y levaduras es el de respuesta a metales (conocido como MRE), sin embargo, este no constituye una constante para todo este grupo de genes; por el contrario, se identifican para todos ellos sitios de reconocimiento para reguladores transcripcionales vinculados con otros procesos celulares (Daffada y Young, 1999; Baumann y Gauldie, 1994).

El gen *mt*, que codifica para la proteína MT, ha sido el mejor caracterizado en su respuesta transcripcional a Cu; su producto génico está presente tanto en levaduras

como en mamíferos y su distribución es ubicua en tejidos animales (Tapiero y col., 2001). Aunque su función no está totalmente definida, se ha relacionado con procesos de respuesta a eventos inflamatorios, de supervivencia celular frente a la exposición a niveles fisiológicos y supra-fisiológicos de Cu (Tapia y col., 2004) y en la detoxificación de cadmio (Cd), Cu y Zn (Palmiter, 1998). En este sentido, existen diferentes evidencias experimentales que indican que la exposición de células en cultivo a estos metales inducen un aumento rápido y significativo en la expresión del gen *mt* (Thiele, 1992; Tapia y col., 2004; Coyle y col., 2002), lo que se traduce en un aumento de la abundancia relativa tanto del transcrito como de la proteína (la que se acumula en el citoplasma y en el núcleo). La regulación transcripcional de *mt* depende de los MREs, los cuales se encuentran presentes en múltiples copias en el promotor de todos los genes conocidos que codifican para MTs (Palmiter, 1994; Samson y col., 1995; Bittel y col., 1998; Koizumi y col., 1999). A estos MREs se une el factor de transcripción de respuesta a metales (MTF-1) que ha sido identificado como el elemento regulador de la expresión de *mt* (Heuchel y col., 1994; Palmiter, 1994; Bittel y col., 1998; Koizumi y col., 1999), el cual se caracteriza por contener cinco dominios de unión al DNA (del tipo "dedos de zinc") de la familia Cys₂His₂. Su unión al DNA es reversiblemente regulada por la interacción de estos dominios con Zn bajo constantes de disociación en el rango micromolar lo que le permite, a diferencia de otros factores de transcripción que contienen "dedos de zinc", detectar cambios en la concentración intracelular de Zn (Palmiter, 1994; Bittel y col., 1998). Considerando estos antecedentes, se han realizado experimentos con diferentes líneas celulares que han permitido proponer mecanismos de acción que dan cuenta del control transcripcional de *mt* vía MTF1. De forma resumida, estos mecanismos postulan que un aumento en el contenido intracelular de Cd y/o Cu permite que estos metales desplacen al Zn de los sitios de unión a MT, lo cual aumenta la disponibilidad de Zn libre en la célula. De este modo Zn sería incorporado a MTF1 permitiendo la unión de esta proteína a los sitios MREs del promotor de *mt* y así la inducción de la transcripción de este gen (Zhang y col., 2003).

4. Interacción entre el metabolismo de Cu, Fe y Zn.

Actualmente, existe amplia evidencia que vincula el metabolismo de Cu con el metabolismo de otros metales traza, como Fe y Zn (Gubler y col., 1952; Harris, 1995; Crichton y Pierre, 2001; Fox, 2002; Garrick y col., 2003; Arredondo y Núñez, 2005). Procesos tales como la incorporación celular de Fe, la actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina (Harris, 1995), la actividad de SOD1 (Roughead y col., 1999) y la inducción de MTs, constituyen ejemplos de este vínculo. Por otra parte, recientes antecedentes han permitido determinar que DMT1, el transportador de Fe^{+2} desde el lumen al enterocito, es también responsable del transporte de Cu^{+1} en células Caco-2 (Arredondo y col., 2003), lo que podría explicar el aumento en el contenido intracelular de Cu en enterocitos y hepatocitos de rata al disminuir la disponibilidad del Fe suministrado en la dieta (Collins y col., 2005). Además, se ha establecido que la capacidad de MT de unir 7 átomos de Zn o hasta 12 átomos de Cu y otros metales como Cd (Richards, 1989), permite alternar el almacenamiento de estos metales, posiblemente pivotando el acoplamiento de diversas rutas metabólicas y sistemas de regulación transcripcional de genes encargados de mantener la homeostasis de estos metales. Esto sugiere que tanto DMT1 como MT podrían ser elementos de interacción y/o regulación del metabolismo de Cu, Fe y/o Zn. En este sentido, se ha establecido en diferentes líneas celulares de mamíferos que un aumento en la disponibilidad de Cu extracelular aumenta el contenido intracelular de Cu y disminuye el contenido de Fe y/o Zn afectando las abundancias relativas que se establecen entre estos metales, siendo el mismo Cu el principal metal afectado (Tapia y col., 2003).

Desde el punto de vista de la regulación transcripcional asociada al vínculo que existe entre estos metales, un amplio número de observaciones indican que algunas proteínas involucradas en el manejo celular de Cu cambian su patrón de expresión génica en respuesta a variaciones en la disponibilidad de Fe y Zn (Murata y col., 1999; Muckenthaler y col., 2003; Collins y col., 2005). Estas variaciones de expresión son dependientes del tipo celular involucrado, indicando que las células de eucariontes

superiores posiblemente conectan el metabolismo de Cu tanto con las vías metabólicas de Fe y Zn de acuerdo al patrón de abundancia relativa que se establece entre ellos como con el papel que desempeñan los distintos tipos celulares en la homeostasis corporal de estos metales.

5. Utilización de hibridación en matrices (arrays) para análisis de expresión génica.

Tradicionalmente, los análisis de expresión génica se han basado en técnicas que permiten cuantificar la abundancia de transcritos de unos pocos genes a la vez. Entre las más utilizadas se encuentra la medición vía PCR semi-cuantitativo, PCR en tiempo real y Northern blot. En la actualidad, los proyectos de secuenciación genómica han obligado a los investigadores a desarrollar tecnologías que permitan analizar la expresión transcripcional de varios genes a la vez. Con este propósito, las hibridaciones sobre matrices (micro y macroarrays) han sido ampliamente utilizadas durante la última década (Freeman y col., 2000), incluyendo investigaciones orientadas al entendimiento del metabolismo de metales. El uso de esta metodología ha permitido identificar genes que están directamente regulados en respuesta a cambios en el estatus intracelular de metales, particularmente en *S. cerevisiae*. Por ejemplo, en este organismo se han examinado genes regulados por el factor de transcripción Zap1p en condiciones limitantes de Zn, (Lyons y col., 2000) y se han identificado genes blancos para los factores de transcripción de Mac1p y Aft1p, que regulan la expresión de genes vinculados al metabolismo de Cu y Fe, respectivamente (Yun y col., 2000; Foury y Talibi, 2001; Gross y col., 2000). Por esta razón, se considera que esta metodología facilita la detección de cambios transcripcionales de múltiples genes contribuyendo al entendimiento de los mecanismos de acción que dan cuenta de la homeostasis de metales.

Como resumen de estos antecedentes, se sabe que en mamíferos el Cu es un micronutriente esencial que puede ser potencialmente tóxico. También, se conocen en forma bastante exhaustiva los componentes que dan cuenta de la homeostasis del metal,

siendo el gen (*mt*) que codifica para la proteína MT el mejor caracterizado en cuanto a su regulación transcripcional, la cual depende del contenido relativo de metales como Cu y Zn. Por otra parte, se ha establecido un estrecho vínculo entre los metabolismos de Cu, Fe y Zn y existe evidencia que permite establecer que cambios en la disponibilidad extracelular de estos metales producen cambios en su contenido intracelular, afectando también las relaciones de contenido entre estos metales.

A pesar de los antecedentes que establecen el vínculo entre el metabolismo de Cu, Fe y Zn, sus bases moleculares están lejos de ser comprendidas. Por esta razón, fue de nuestro interés evaluar los efectos de la exposición a Cu sobre las relaciones de contenido intracelular con otros metales (Cu/Fe, Cu/Zn, Fe/Zn) en función de las modificaciones de las redes transcripcionales involucradas en la homeostasis de estos tres metales y otros encargados de defensa contra el daño oxidativo. Para esto se emplearon poblaciones de transcritos provenientes de células HepG2 y Caco-2 (sólo en términos comparativos) que representan a nivel sistémico los tejidos más relevantes en la regulación del metabolismo del Cu (hepático e intestinal, respectivamente). En este estudio se utilizaron condiciones de exposición que incrementaron significativamente el contenido intracelular de Cu y la abundancia relativa del mRNA que codifica para MT. La modificación en la abundancia relativa de 38 transcritos de genes seleccionados por su vinculación al metabolismo de metales fue evaluada mediante hibridación sobre membranas de nylon (macroarrays) y verificada, en algunos casos, mediante ensayos de amplificación por PCR en tiempo real.

Finalmente, para evaluar si la exposición a Cu en las condiciones utilizadas afectaba parámetros de viabilidad y estrés, se incluyó en los análisis la medición de estos, con el fin de interpretar si los cambios en la abundancia relativa de transcritos fueron consecuencia única de las modificaciones en el contenido intracelular de metales y sus relaciones y/o consecuencia de las modificaciones fisiológicas producidas en las células por la exposición a una concentración supra-fisiológica de Cu.

6. Hipótesis.

Un aumento en la disponibilidad extracelular de Cu afecta el patrón de abundancia relativa de transcritos que codifican para proteínas vinculadas al metabolismo del propio Cu como también de Fe y Zn en células HepG2, lo cual es dependiente no sólo del contenido intracelular de cada metal, sino también de las relaciones de abundancia que se establecen entre ellos.

7. Objetivo general.

Evaluar cambios en los patrones de abundancia relativa de transcritos vinculados al metabolismo de Cu, Fe y Zn, entre células no expuestas y expuestas a una concentración supra-fisiológicas de Cu y determinar si estos cambios se explican por las variaciones en las relaciones entre los metales traza en cuestión y/o por las alteraciones fisiológicas celulares generadas en respuesta al tratamiento.

8. Objetivos específicos.

a. Cuantificar el contenido intracelular de Cu, Fe y Zn en células HepG2 no expuestas y expuestas a una concentración supra-fisiológica de Cu y determinar su efecto sobre la viabilidad celular, la producción de ROS y la abundancia relativa del transcrito y de la proteína MT.

Con el propósito de comparar los resultados obtenidos en células HepG2, estos ensayos se realizaron también en células Caco-2 expuestas a las mismas condiciones, dado que esta línea celular ha sido ampliamente utilizada en investigaciones dirigidas al entendimiento del metabolismo celular de Cu y Fe. Además, ambos tipos celulares fueron expuestas al quelante de Fe: deferoxamina (DFO), con el propósito de modificar las proporciones de contenido de Cu y Fe por una vía independiente al suplemento con Cu.

b. Completar y caracterizar una librería de cDNAs vinculados al metabolismo de Cu, Fe, Zn y defensa contra daño oxidativo de humanos.

Para lograr este objetivo se realizó una revisión bibliográfica para identificar genes involucrados en el metabolismo de metales traza. Sus clones fueron comprados cuando su inserto fue un cDNA de largo completo o clonados cuando estos no estuvieron disponibles comercialmente. Todos los clones fueron verificados y amplificados para ser sembrados en membranas de nylon, para los ensayos de hibridación.

c. Desarrollo de un procedimiento de hibridación en membranas de nylon para monitorear en forma simultánea cambios de expresión génica en múltiples genes involucrados en metabolismo de metales y defensa contra el daño oxidativo entre células no expuesta y expuestas a Cu o DFO.

Con el objetivo, de evaluar si las modificaciones en la abundancia relativa de metales traza y sus relaciones en células HepG2 expuestas a Cu o DFO afectan el patrón de abundancia de transcritos que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de Cu, como también de Fe y Zn, se determinaron las condiciones más adecuadas para el marcaje de la sonda, las condiciones de hibridación, detección y recuperación de señales confiables de hibridación y normalización de datos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Líneas celulares.

Durante el desarrollo de esta tesis se utilizaron dos líneas celulares humanas. La línea celular HepG2 proveniente de carcinoma hepatocelular, fue adquirida desde American Type Culture Collection, Rockville MD (Número de acceso HB-8065). La línea celular Caco-2 proveniente de adenocarcinoma colorectal con características de enterocito, fue donada por el Dr. Miguel Arredondo Olgún (INTA – Universidad de Chile, Santiago, Chile). Las células Caco-2 fueron utilizadas con el fin de contrastar los resultados obtenidos en los ensayos con células HepG2 para idénticos tratamientos.

1.2. Células procariontes.

Se utilizaron las cepas bacterianas DH5 α y JM109 de *E. coli* (Promega, WI, USA) para los clonamientos y amplificación de las secuencias génicas de interés.

1.3. Vectores.

Los plasmidios utilizados fueron los siguientes:

a) **pGEM -T Easy.** Este vector fue obtenido de Promega, WI, USA y utilizado como vector para todos los fragmentos de DNA clonados durante esta tesis. Este vector contiene regiones promotoras SP6 y T7 que flanquean una región de clonamiento con múltiples sitios de restricción la cual esta contenida dentro de la región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa, por lo que la inserción de un fragmento de DNA en esta región inactiva el péptido permitiendo la selección de clones portadores del inserto. Para ello, las colonias transformadas son crecidas en medio con x-gal, sustrato de la enzima β -galactosidasa. Colonias azules indican que no hubo ligación del inserto mientras que

colonias blancas indican ligaciones positivas. Todas las colonias transformantes fueron seleccionadas por su resistencia a ampicilina, conferida gracias a la presencia de la secuencia codificante para β -lactamasa contenida en este vector.

b) pcDNA3.1 (+). Este vector fue obtenido de Invitrogen, CA, USA. Contiene el promotor de células eucariotes CMV y los genes de resistencia a ampicilina y neomicina.

c) pOTB7, pCMV-Sport6, pBluescriptR, pT3T7-Pac, pDNR-LIB. Estos vectores con sus respectivos insertos fueron obtenidos desde la librería de clones con marco de lectura abierto y largo completo (FL-ORF) de la colección de genes de mamíferos (MGC) del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, por medio de Open Biosystems, Inc., Huntsville, USA. Estos vectores contienen la región promotora T7, SP6 o T3 que flanquean regiones de clonamiento con múltiples sitios de restricción y los genes de resistencia a ampicilina o cloranfenicol.

d) pBluescript II KS (+). Este vector con su inserto fue adquirido desde American Type Culture Collection, Rockville MD (Número de acceso 87468). Contiene regiones promotoras SP6 y T7 que flanquean una región de clonamiento con múltiples sitios de restricción y el gen de resistencia a ampicilina.

e) pTrcHis2 Topo TA. Este vector fue obtenido de Invitrogen, CA, USA y utilizado como vector de clonamiento y expresión para la región codificante del transportador de alta afinidad para Cu (*ctr1*). Este vector posee un codón de inicio correctamente espaciado para la unión ribosomal y dos codones río abajo, un sitio de inserción para el producto de PCR de interés. Posee la secuencia que codifica para un epítipo *myc*, una región terminal de poli-histidina y el gen de resistencia ampicilina. Algunas características de los insertos ligados a estos vectores se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de clones que forman parte de la librería de cDNAs vinculados al metabolismo de metales y defensa contra el daño oxidativo. La tabla muestra de izquierda a derecha el símbolo (nombre) de los genes que forman parte de la genoteca, el vector (plásmido) donde se encuentran clonados, el tamaño del inserto, el origen del clon y los partidores utilizados para generar los productos de amplificación sembrados en las membranas de hibridación.

Símbolo (Nombre)	Vector	Tamaño Inserto (pb)	Origen del clon	Partidores PCR
<i>rbcS</i>	I Zap	632	Disponible en Lab.	(T3-T7)
<i>dap</i>	pBluescript II KS+	431	Disponible en Lab.	Específicos
<i>tf</i>	pBluescriptR	2330	Comprado MGC	(T3-T7)
<i>hfe (hla-h)</i>	pcDNA3	1064	Disponible en Lab.	(SP6-T7)
<i>hepc-hamp</i>	pcDNA3 myc -His	280	Disponible en Lab.	Específicos
<i>app</i>	pcDNA3.1(+)	2121	Disponible en Lab.	Específicos
<i>prnp</i>	pCMV-SPORT6	435	MGC	Específicos
<i>sco1</i>	pCMV-SPORT6	1399	MGC	(SP6-T7)
<i>dcytb</i>	pCMV-SPORT6	1057	MGC	(SP6-T7)
<i>lreg1</i>	pCMV-SPORT6	2170	MGC	Específicos
<i>irp1-aco1</i>	pCMV-SPORT6	530	MGC	(SP6-T7)
<i>mt</i>	pDNR-LIB	465	MGC	Específicos - (M13 R-T7)
<i>murr1</i>	pDNR-LIB	735	MGC	(M13 R-T7)
<i>cox11</i>	pDNR-LIB	1629	MGC	(M13 R-T7)
<i>ctr2</i>	pGEM-T Easy	524	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>atp7a, mnk</i>	pGEM-T Easy	202	Disponible en Lab.	(SP6-T7)
<i>atp7b, wd</i>	pGEM-T Easy	403	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>cp</i>	pGEM-T Easy	490	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>sod1</i>	pGEM-T Easy	260	Disponible en Lab.	Específicos - (SP6-T7)
<i>cox17</i>	pGEM-T Easy	350	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>atox1</i>	pGEM-T Easy	318	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>ccs</i>	pGEM-T Easy	531	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>sco2</i>	pGEM-T Easy	475	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>tfr2</i>	pGEM-T Easy	580	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>irp2-ireb2</i>	pGEM-T Easy	428	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>cubn</i>	pGEM-T Easy	506	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>mtf1</i>	pGEM-T Easy	324	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>gcs</i>	pGEM-T Easy	390	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>gpdh</i>	pGEM-T Easy	538	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>actβ</i>	pGEM-T Easy	545	Clonado en Tesis	Específicos - (SP6-T7)
<i>tuba2</i>	pGEM-T Easy	321	Disponible en Lab.	(SP6-T7)
<i>cg6132</i>	pGEM-T Easy	729	Disponible en Lab.	(SP6-T7)
<i>aplp2</i>	pOTB7	315	MGC	Específicos
<i>tfr</i>	pOTB7	401	MGC	(SP6-T7)
<i>dmt1</i>	pOTB7	2179	MGC	(SP6-T7)
<i>heph</i>	pOTB7	454	MGC	Específicos
<i>fth1</i>	pOTB7	238	MGC	Específicos
<i>ftl</i>	pOTB7	878	MGC	(SP6-T7)
<i>abcb7</i>	pOTB7	2360	MGC	(SP6-T7)
<i>fxn</i>	pOTB7	2130	MGC	(SP6-T7)
<i>hmox1</i>	pOTB7	1574	MGC	(SP6-T7)
<i>zirtl</i>	pOTB7	2041	MGC	Específicos - (SP6-T7)
<i>gsr</i>	pT7T3D-Pac	780	MGC	(T3-T7)
<i>ctr1</i>	pTrcHis2-TOPO	663	Clonado en Tesis	Específicos

1.4. Partidores.

La amplificación por PCR de las secuencias de interés fue realizada con partidores diseñados utilizando el programa Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International) y sintetizados por Alpha DNA (Québec, Canadá). Las parejas de partidores poseen una temperatura de melting (T_m) que difieren en menos de 4 °C, no forman dímeros de partidores, ni autocomplemento de bases según las predicciones del programa utilizado en su diseño. Las secuencias sentido y antisentido se expresan desde el extremo 5' al 3'.

Tabla 2. Partidores utilizados en la amplificación de fragmentos de PCR. La tabla muestra la lista de todos los partidores utilizados en los experimentos de amplificación de segmentos por PCR para clonamientos y/o desarrollo de matrices de hibridación sobre membranas de nylon. Estos partidores amplifican fragmentos de tamaño variable y fueron desarrollados suponiendo su utilización en PCR convencional y PCR en tiempo real. Las últimos cuatro secuencias de lista corresponden a partidores universales de vectores comerciales.

Gen	Partidor Sentido	Partidor Antisentido
<i>ctr1</i>	GGGTGACGGGTTAAGATTCG	ATGGCAATGCTCTGTGATATC
<i>ctr2</i>	GGAGAAGGGTCTTGGTGAT	AGATGAGGATAAAGGAGGGC
<i>atp7b</i>	CAAACCTCACGAGGACAAATG	GGCCTGAACGTAGAAGTAC
<i>mt</i>	ATGGATCCCACTGCTCCTGCG	AGGGCTGTCCCAACATCAGGC
<i>prnp</i>	CGAACCTTGGCTGCTGGAT	CCTCATAGTCACTGCCGAAA
<i>apl2</i>	GTGGAATAGGGAAGTGAAT	GGGGAAGTGAACGGTAAAA
<i>app</i>	CACCACAGAGCTTGTGGAAG	AGGTGTCTCGAGCTACTTGT
<i>cp</i>	GAGCCGATTGGGGTGAGAT	CTTGCACATAGTGAGACCC
<i>sco2</i>	AGTGGGTGCTGATGTACTTTG	CGCAGCCCGTTTAAATGATGG
<i>atox1</i>	CTGTGGAGGCTGTGCTGAA	AGGAATAGGACAAGTGGGGT
<i>cox17</i>	ACGAATCGGCGTTTGCC	TTCCACATATCAAAGTTCGT
<i>ccs</i>	ACAGCTGACCCCTGAGCG	ACAGAGCCAAGGTGAGGTC
<i>tfr1</i>	CTGCCTCTTTCCTGTTGTTG	ACTAAGTCTTGGCTTCTGGT
<i>tfr2</i>	CAAGGAGTGCTCATATACCC	AGCCCACGCTTCCAAAGTC
<i>irp2</i>	AGAGACTGGGCTGCCAAAGG	TACTGGGACTATCTGCTGCTC
<i>cubn</i>	TGGGAAAGGTCCTGCGTATC	AGTAGTCTGGAGCGGTGGG
<i>fth1</i>	AATACTTCTCCACCAATCTC	TTGTCAGTAGCCAGTTTGTG
<i>ireg1</i>	TGTGGCTTTATTCGGGATG	AGGCTGGTTGTAGTAGGAG
<i>heph</i>	GTCTACTACCTGGGCATCC	GGTCAGCATCGGTGGGTG
<i>hepc</i>	CAGTGGGACAGCCAGACA	AATAAATAAGGAAGGGAGGG
<i>zirt1</i>	CTGCTGTGGAACGGGTATGG	CTTGGGCTCCTCGGGTGTAT
<i>mtf1</i>	AAGCCGACAAGCAGAGACT	CTGGGATGTGAATAAAGAAAA
<i>gcs</i>	ATCCTCCAGTTCCTGCACAT	TGTGAACCCAGGACAGCCTA
<i>actβ</i>	CAGTGGGACAGCCAGACA	AATAAATAAGGAAGGGAGGG
<i>gpdh</i>	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
<i>dap</i>	TTGCATTAGAGCACGGAGTC	GCGTATCTGAAGCGTTTGG
<i>T7</i>	TAATACGACTCACTATAGGG	
<i>SP6</i>		ATTTAGGTGACACTATAGAAT
<i>T3</i>		ATTAACCCTCACTAAAGGGA
<i>M13-R</i>		GGAAACAGCTATGACCATG

1.5. Anticuerpos.

- a) Anti-Metalotioneína. Corresponde a un anticuerpo monoclonal producido contra metalotioneínas I y II (MTI/II) de ratón por la empresa Dako, CA, USA. Este anticuerpo reacciona contra un epítipo conservado en ratón y humano, organismos en los cuales ha sido probado y validado (Tapia y col., 2004; Arredondo y col., 2004).
- b) Anti-IgG: Corresponde a un anticuerpo monoclonal producido contra Inmunoglobulina G de ratón por la empresa Rockland, PA, USA. Este anticuerpo se encuentra conjugado a fluoresceína isotiocianato (FITC) la que presenta un máximo de emisión a 528 nm.
- c) Faloidina (Alexa Fluor 594 phalloidin). Corresponde a un péptido bicíclico aislado de *Amanita phalloides* que reconoce y une a microfilamentos de actina (f-Actina) la que presenta un máximo de emisión a 609 nm. Este péptido fue adquirido en Molecular Probes (OR, USA).

1.6. Sales y reactivos.

Las sales y reactivos en solución fueron adquiridos en Merck, Sigma o Winkler Ltda.

2. MÉTODOS

2.1. Cultivo celular.

2.1.1. Manejo de líneas celulares en cultivo.

Las dos líneas celulares utilizadas en esta tesis fueron mantenidas en un incubador bajo similares condiciones de cultivo (37 °C y presión constante de 5 % de CO₂). Las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB) y los antibióticos penicilina (100 UL/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) utilizando placas de Petri de 96 mm o frascos T25 (González y col., 1999; Tapia y col., 2003). Además, las células HepG2 fueron suplementadas con 1 mM de piruvato de sodio. Cada 2-3 días, las células fueron lavadas

dos veces con buffer fosfato salino (PBS) y el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco.

2.1.2. Almacenamiento de las líneas celulares.

Ambas líneas celulares fueron almacenadas en alícuotas aproximadas de 1×10^6 células, en medio DMEM suplementado con 10 % v/v de SFB y 10 % v/v de DMSO en criotubos de 1,8 ml a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.3. Tratamientos con Cu:His o DFO.

El medio de cultivo estándar utilizado (descrito en 2.1.1.) alcanza concentraciones de metales traza de $0,44\text{ }\mu\text{M}$ de Cu, $2,69\text{ }\mu\text{M}$ de Fe y $3,8\text{ }\mu\text{M}$ de Zn (Tapia y col., 2003). Para los tratamientos con Cu, el metal fue suplementado como complejo Cu:His (razón 1:10) a una concentración fija ($100\text{ }\mu\text{M}$) y tiempos variables (8, 12, 24 y 48 h), mientras que el DFO fue suplementado a concentración ($100\text{ }\mu\text{M}$) y tiempo (48 h) fijos en placas de Petri de 96 mm, en ambas líneas celulares. Para la línea celular HepG2, los tratamientos se realizaron cuando éstas alcanzaron un 80 % de confluencia y en células Caco-2 los tratamientos se realizaron luego de 17 días de post-confluencia con el objetivo de estabilizar la expresión de algunos transcritos (aspecto que se reforzó manteniendo el mismo tiempo de cultivo para todos los tiempos de tratamiento, en ambas líneas celulares). Inmediatamente alcanzados los tiempos indicados, las células se recuperaron mediante un tratamiento suave con tripsina-EDTA a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3-5 min, previo a tres lavados con PBS. Las células recuperadas fueron centrifugadas a 2500 rpm por 5 min y el pellet fue resuspendido en 1 ml de PBS (González y col., 1999). Alícuotas de $100\text{ }\mu\text{l}$ fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para medición de metales y cuantificación de proteínas y eventuales ensayos de Western blot. Los $700\text{ }\mu\text{L}$ restantes fueron inmediatamente utilizados para extracción de RNA, necesario para ensayos de expresión génica.

2.2. Determinación del estado de parámetros celulares.

2.2.1. Cuantificación del contenido intracelular de metales traza.

Las células tratadas y no tratadas con Cu:His o DFO fueron recuperadas mediante tripsinización y lavadas en PBS como se indica en la sección 2.1.3. Alícuotas de $1-2 \times 10^6$ células fueron centrifugadas a 2.500 rpm por 5 min. El pellet de células fue resuspendido en 1 ml de agua desionizada bi-distilada y ácido nítrico (65 % v/v) y luego incubadas a 65 °C durante 16 h para completar la lisis ácida (González y col., 1999). El contenido intracelular de Cu y Fe fue cuantificado en un espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito (SIMMA 6100, Perkin Elmer) con límite de detección en fracciones de ppb, mientras que el contenido de Zn, se cuantificó en un espectrómetro de absorción atómica con horno de llama (2280 Perkin Elmer) que tiene un límite de detección en ppm. El contenido de todos los metales se determinó por interpolación desde curvas de calibración generadas a partir de diluciones seriadas de concentraciones conocidas para cada metal.

2.2.2. Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford. Alícuotas de $1-2 \times 10^6$ células tratadas y no tratadas con Cu:His o DFO fueron centrifugadas a 2.500 rpm por 5 min. El pellet fue resuspendido en buffer de lisis (NaOH 0,5 N; tritón 0,1 % v/v) y se tomaron alícuotas que fueron resuspendidas en agua destilada y reactivo de Bradford (razón 4:1). Junto a cada grupo de proteínas se leyó una curva estándar que contiene concentraciones conocidas de albúmina de suero de bovino (BSA 0-12 µg/ml) en el mismo buffer en que fueron disueltas las muestras. La cuantificación colorimétrica se realizó en un espectrofotómetro (Perkin Elmer MBA 2000) midiendo a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteínas de cada muestra fue interpolada desde la curva estándar de absorbancia generada con BSA.

2.2.3. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Las células HepG2 y Caco-2 fueron sembradas sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos (Nalge Nunc Int. Corp. IL, USA). Cuando las células alcanzaron las condiciones de cultivo y tratamientos indicadas en la sección 2.1.3. fueron lavadas dos veces con PBS, y se fijaron con una solución de formaldehído al 3,7 % v/v en PBS, durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se permeabilizaron con una solución de formaldehído 3,7 % v/v más Tritón X-100 al 0,2 % v/v por 5 min a temperatura ambiente, tras lo cual se realizaron dos lavados con PBS y se bloqueó con una solución de BSA al 3 % p/v en PBS, por 45 min. Luego, las células se incubaron con el anticuerpo primario (anti-MT), diluido 1:50 en solución de bloqueo, durante 45 min a 37 °C. Se lavaron las células dos veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a FITC diluido 1:100 en la solución de bloqueo, durante 45 min a 37 °C. Se lavaron las células tres veces con PBS y se incubaron con una dilución de 1:50 de Faloidina durante 30 min a 37 °C, seguido de tres lavados con PBS y una vez con agua destilada. Finalmente, se montaron sobre portaobjetos de vidrio. Para la visualización, las células se observaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon). Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital (Kodak Digital Science DC120).

2.2.4. Cuantificación de la fluorescencia asociada a la proteína MT.

A partir de las imágenes capturadas desde las IFI para MT se cuantificó la emisión fluorescente en forma indirecta cuantificando las unidades energéticas por píxeles mediante análisis digital con los programas Adobe® Photoshop® 6.0 y MATLAB® (Mosedale y col., 1996; Matkowskyj y col., 2000; Matkowskyj y col., 2003). Para cada tiempo de exposición a Cu:His o DFO (señaladas en la sección 2.1.3.) se obtuvieron tres fotografías representativas de la población celular, las cuales fueron editadas ajustando los niveles de entrada y salida en 225 y 2 unidades respectivamente, para el canal rojo y azul en Adobe® Photoshop® 6.0. Posteriormente se seleccionaron tres cuadrantes de

cada fotografía las cuales fueron almacenadas en archivos de formato TIFF de alta resolución, estas fueron analizadas vía MATLAB® con el algoritmo descrito por Matkowskyj (Matkowskyj y col., 2000), restando en cada caso la intensidad de fluorescencia obtenida desde el cuadrante seleccionado como ruido de fondo, en cada caso.

2.2.5. Cuantificación de la viabilidad celular.

El análisis de viabilidad celular se realizó en células expuestas bajo las condiciones señaladas en la sección 2.1.3., en placas de 24 pocillos a través de la cuantificación de un marcador de la actividad mitocondrial; MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Mosmann y col., 1983). Luego de los tratamientos con Cu:His o DFO, las células de ambas líneas celulares fueron lavadas una vez con PBS e incubadas en medio de cultivo DMEM fresco con MTT (5 mg/ml) durante 1 h a 37 °C. Luego se retiró el medio y se detuvo la reacción con isopropanol 70 % v/v y HCl 0,04 M, lo que permitió solubilizar y cuantificar la producción de formazán registrando la diferencia en la absorción a 630 nm y 570 nm en un lector de absorbancia en microplacas ELx800™ (Bio-Tek Instrument, VT, USA). Los valores de viabilidad obtenidos en el ensayo se expresaron como porcentaje respecto a los valores obtenidos en las muestras controles, los cuales representaron el 100 %.

2.2.6. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

La cuantificación intracelular de las especies reactivas de oxígeno se realizó en células expuestas bajo las condiciones señaladas en la sección 2.1.3., en placas de 24 pocillos gracias a la fluorescencia emitida por la acetilación y oxidación intracelular del compuesto 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H2DCF-DA). Luego de los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS e incubadas en buffer HBS glucosa-H2DCF-DA (20 µM) a 37 °C durante 15 min como se describe en Myhre y col., 2003. Luego, las células fueron lavadas dos veces con PBS y lisadas en solución NaOH 0,1 N

para detectar la fluorescencia emitida por la sonda. Las muestras fueron excitadas a 485 nm y la emisión registrada a 530 nm en placas de 96 pocillos de fondo oscuro en un lector de fluorescencia (Spectramax Gemin EM). Los valores de fluorescencia fueron normalizados por el contenido de proteínas totales en cada muestra y se expresaron como porcentaje respecto a los valores obtenidos en los controles.

2.3. Procedimientos de biología molecular.

Todos los procedimientos de biología molecular se realizaron como se describe en Ausubel y col., 1999.

2.3.1. Electroforesis.

En todos los casos, la electroforesis para DNA se realizó en geles de agarosa al 1 % p/v en buffer TAE 1X (Tris-HCl, ácido acético, EDTA), mientras que las electroforesis para RNA se realizaron en geles denaturantes de agarosa al 1,2 % p/v (MOP 10X, formaldehído al 7 % v/v, formamida desionizada 1X) en buffer MOPS 1X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio al 0,1 % v/v y las bandas fueron observadas en un trans-iluminador de luz ultravioleta (Vilber Lourmat). Los geles fueron posteriormente fotografiados con una cámara Kodak Dc 290 para su registro y posterior análisis.

2.3.2. Cuantificación de DNA y RNA.

Las concentraciones de DNA y RNA se determinaron por fluorimetría utilizando las sondas PicoGreen® y RiboGreen® (Invitrogen, CA, USA), respectivamente. Para ello, 1 µL de cada muestra fue diluida en buffer TE (Tris-EDTA) y mezclada con solución buffer TE-fluoróforo en la dilución apropiada, cuantificando la fluorescencia emitida en fluorómetro (Spectramax Gemin EM). La concentración se determinó a partir de la curva de calibración generada desde diluciones seriadas de una muestra de DNA o RNA de concentración conocida. Un segundo método de cuantificación fue mediante el análisis densitométrico de las bandas observadas en geles de agarosa. Para esto, luego de las

electroforesis, los geles fueron fotografiados y las fotografías analizadas con el programa KODAK 1D. Así se calculó la concentración desconocida comparándola con el valor de intensidad de bandas de concentraciones conocidas presentes en el marcador de peso molecular MassRuler® (Fermentas). Un tercer método de cuantificación fue mediante densidad óptica en un espectrofotómetro (Perkin Elmer MBA 2000) utilizando cubetas de cuarzo. Este método se utilizó como alternativa para verificar las mediciones realizadas por densitometría.

2.3.3. Mantenimiento de cultivos bacterianos.

Las cepas bacterianas utilizadas en esta tesis fueron crecidas en medio LB (10 g bactotripton, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, en un litro de agua destilada y desionizada a pH 7,5) a 37 °C con agitación constante (225 rpm) por 16 h, en tubos cónicos de 15 ml, 50 ml o matraces de vidrio de 250 ml dependiendo del volumen de cultivo necesario. El medio fue suplementado con ampicilina (100 µg/ml) o cloranfenicol (50 µg/ml) dependiendo del tipo de resistencia a antibiótico que confiere el plasmidio con que fueron transformadas las bacterias.

Para clonar genes y aislar colonias, las bacterias fueron sembradas en un medio sólido LB-agar (medio LB más 15 g de agar en un litro de agua destilada y desionizada) con el antibiótico apropiado en las concentraciones mencionadas anteriormente y crecidas a 37 °C por 16 h sin agitación. Para almacenar bacterias, estas fueron resuspendidas en medio LB suplementado con 15 % v/v de glicerol estéril y congeladas a -80 °C.

2.3.4. Extracción de DNA plasmidial.

El DNA plasmidial fue extraído por el método de lisis alcalina. Un volumen de 3 ml de cultivo de bacterias crecidas durante 16 h se centrifugó a 13.000 rpm por 2 min. Las células fueron resuspendidas en 200 µL de solución I (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA) y

posteriormente agitadas en vortex. Luego se lisaron en 200 μ L de solución II (1 % p/v SDS, 0,2 M NaOH). El contenido se mezcló por inversión seis veces y se adicionó a 200 μ L de acetato de potasio 3 M. La solución se centrifugó por 15 min a 13.000 rpm y se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio y se le agregó 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:25:1). Se centrifugó 10 min a 13.000 rpm y se recuperó la fase acuosa a la cual se le agregó 0,7 volúmenes de isopropanol, se mezcló y centrifugó 10 min a 13.000 rpm. El pellet se lavó con 1 ml de etanol 70 % v/v y luego de centrifugar 10 min a 13.000 rpm, el pellet se dejó secar a temperatura ambiente, resuspendiéndolo posteriormente en agua libre de nucleasas. Para los casos en que se necesitó mayor masa y pureza de DNA plasmidial, la extracción se hizo a partir de 50 ml de cultivo bacteriano utilizando el kit Wizard Plus Midipreps DNA Purification System® (Promega), basándose en los mismos principios de la lisis alcalina pero adicionalmente utilizando columnas de afinidad donde se lava y recupera el DNA plasmidial. La calidad y rendimiento de la extracción de DNA plasmidial se evaluó en todos los casos por electroforesis en geles de agarosa.

2.3.5. Extracción de RNA total y purificación de mRNA.

El RNA total fue extraído desde las células tratadas y controles (ver sección 2.1.3.) homogeneizadas en RNAwiz® (Ambion) por contacto mecánico con jeringas para insulina de 1 ml (BD * Plastipack *). 0,2 volúmenes de cloroformo fueron a agregados a esta mezcla, sometiéndola a agitación y centrifugación y recuperando el RNA en la fase acuosa superior, el que posteriormente fue precipitado con isopropanol mediante centrifugación. El pellet precipitado fue lavado con etanol 75 % v/v (diluido en agua libre de RNAsas) y precipitado por centrifugación. Finalmente, el RNA fue resuspendido en agua libre de nucleasas.

La integridad del RNA fue verificada por electroforesis en geles denaturantes de agarosa, mientras que la calidad se evaluó mediante diferentes métodos incluyendo ensayos espectrofotométricos, que miden la razón entre las absorbancias medidas a

longitudes de onda de 260 y 240 nm (que representan la relación entre ácidos nucleicos y fenoles) y la razón entre las absorbancias medidas a longitudes de onda de 260 y 280 nm (que representan la relación entre ácidos nucleicos y proteínas en la muestra). Adicionalmente, la calidad del RNA extraído se avaluó mediante la síntesis de cDNA y la amplificación de algunos genes (como *gpdh* y *fth1*) por PCR a partir de este cDNA.

Una vez comprobada la integridad y calidad del RNA total extraído, se procedió a purificar el mRNA utilizando el Kit Oligotex mini (Quiagen). Para esto, 100 – 200 ng de RNA total denaturado (70 °C por 3 min) se incubó con suspensión oligotex (partículas de látex poliestireno acoplado a un oligonucleótido dT30) para permitir la hibridización con los mRNA poliadenilados. Posteriormente esta mezcla se centrifuga para colectar el complejo mRNA-Oligotex, el cual se resuspende sobre columnas de afinidad que permiten lavar el complejo y eluir específicamente los mRNAs con los buffer apropiados. A cada muestra purificada se le agregaron 40 unidades de inhibidor de ribonucleasas, Rnasin® (Promega).

2.3.6. Transcripción *in vitro* de *dap*.

El clon del gen *dap* (codifica para la proteína Dihydrodipicolinato reductasa de *Bacillus subtilis*), obtenido desde American Type Culture Collection (ATCC 87486), fue utilizado como control heterólogo de la retrotranscripción y para seleccionar el gen más adecuado para normalizar los datos de expresión génica. El plásmido pBluescript II KS (+), que contiene el gen, fue purificado mediante el kit Wizard Plus (Promega). El plásmido purificado fue digerido con la enzima de restricción *NotI* con el fin de linearizar el constructo plásmido-inserto, el resultado de esta digestión fue verificado por ensayos de electroforesis como se muestra en la figura 18A. Utilizando el plásmido linearizado se procedió a sintetizar el mRNA correspondiente al gen *dap* mediante la transcripción realizada por la RNA polimerasa T7. Este mRNA se purificó incubando el producto de la síntesis con DNasa y precipitando el mRNA con isopropanol y acetato de sodio 3 M,

posteriormente se cuantificó por fluorometría y verificó su integridad en ensayos de electroforesis como se muestra en la figura 18A.

2.3.7. Síntesis de cDNAs no radioactivos.

La síntesis del cDNA de hebra simple se realizó usando como templado RNA total (2 µg) o mRNA (50 ng). En ambos casos y para cada una de las muestras, el RNA se incubó con 0,5 µg de partidor oligo dT (Promega) y 2 ng del mRNA de *dap*, durante 5 min a 70 °C para deshacer las estructuras secundarias del RNA y así permitir el alineamiento con el partidor. Además, 200 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y 12,5 µM de dNTP (Promega) se incluyeron en esta reacción y se incubó a 42 °C durante 90 min para posteriormente proceder a inactivar la enzima a 70 °C por 15 min. Finalmente, el cDNA fue guardado a -20 °C hasta el momento de su utilización.

2.3.8. PCR Cuantitativo en tiempo real (q-RT PCR).

Una aproximación experimental complementaria utilizada en esta tesis a los ensayos de hibridación en macroarrays fue la cuantificación de la abundancia relativa de los transcritos analizados mediante PCR cuantitativo en tiempo real, empleando para ello el kit Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche). Cada reacción de amplificación se realizó en capilares de vidrio utilizando 50 ng de cDNA; 0,5 µM de cada partidor; 1,5 mM de MgCl₂ y 2 µL de LC-FasterStart DNA Master SYBR Green I, 10x (Roche) en 20 µL de reacción. Las reacciones de PCR fueron realizadas en el termociclador Light Cycler Instrument (Roche) y el programa de amplificación se diseñó utilizando el programa Light Cycler v.3.5 (Roche). Este programa consta de una fase de activación a 95 °C durante 10 min y una etapa de amplificación que consta de 35-40 ciclos de un paso de 95 °C por 3 s, alineamientos de los partidores al templado a la temperatura adecuada para cada pareja de partidores por 15 s y un paso a 72 °C por 10 s. La medida de la abundancia de cada transcrito en la muestra fue calculada a partir de

los datos obtenidos de la curva de calibración, la cual fue construida a partir de diferentes concentraciones conocidas de productos de amplificación por PCR purificados, específicos para el transcrito de interés en cada caso.

2.4. Construcción de la genoteca.

2.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para amplificar fragmentos de DNA se realizaron PCR en volúmenes finales de 25 ó 50 μ l. Como DNA templado se utilizó DNA plasmidial o cDNA generado de las muestras de RNA obtenido de células HepG2 o Caco-2. En todos los casos se utilizaron entre 100 y 400 ng de DNA templado los cuales fueron mezclados con buffer de PCR 1X (Invitrogen), 10 mM dNTPs, 50 mM MgCl₂, 10 mM de partidores sense y antisense y 2 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Esta reacción se incubó en un termociclador PTC-100 (MJ Research), utilizando un programa de amplificación que comprende un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min; 25-35 ciclos de desnaturalización por 45 s, alineamientos a la temperatura adecuada (dependiendo de la T_m de los partidores), por 30 s y extensión a 72 °C considerando 1 min por cada Kb de producto a amplificar y finalmente, se incorporó un paso de extensión final a 72 °C durante 5 min. Las reacciones de amplificación fueron verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa y para los clonamiento de fragmentos de DNA y producción de curvas de calibración para la q-RT PCR, donde se necesitó una alta pureza del producto amplificado, las bandas se purificaron utilizando el JET Quick Gel Extraction Spin (Genomed).

2.4.2. Ligación

Para ligar los productos de amplificación por PCR al vector pGEM-T Easy o pTrcHis2 Topo TA en el caso de *ctr1* (ver tabla 1), se utilizaron razones de 1:8 entre las masas del producto de amplificación purificado y el vector, los cuales se incubaron con la enzima T4 DNA ligasa y su buffer, además de agua libre de nucleasas hasta completar 10 μ L de reacción. Esta reacción fue incubada durante 16 h a 4 °C.

2.4.3. Transformación bacteriana.

Alícuotas de 2 μ L de la reacción de ligación fueron desnaturaladas a 70 °C por 10 min para detener la reacción de ligación (por inactivación de la enzima) y luego mantenidas en hielo. En condiciones de asepsia, estas alícuotas fueron mezcladas con 50 μ L de bacterias *E. coli* competentes y mezcladas suavemente manteniéndolas en hielo durante 30 min al cabo de los cuales se aplicó un golpe de calor de 37 °C, durante 45 s. Luego de incubar las células en hielo durante 2 min, se les agregó 950 μ L de medio SOC (10 mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, glucosa 0,4 % v/v en medio SOD estéril compuesto por triptona 2 % p/v, extracto de levadura 0,5 % p/v, NaCl 10 mM y KCl 2,5 mM) y fueron incubadas por 1 h a 37 °C con agitación suave. Las bacterias fueron sembradas sobre placas de Petri con LB-agar y ampicilina (100 μ g/ml) sobre las que se sembró 100 μ L de IPTG 0,1 M y 20 μ L de x-gal (50 μ g/ml) e incubadas por 16-18 h a 37 °C, sin agitación.

2.4.4. Selección de transformantes

Los transformantes que llevan inserto fueron seleccionados por su resistencia a ampicilina y por su incapacidad de degradar el x-gal, lo que originó el crecimiento de colonias blancas. Algunas colonias fueron tomadas desde la placa con puntas estériles y crecidas en medio LB ampicilina para su análisis. Aquellas que resultaron positivas para el inserto clonado fueron almacenadas a -80 °C (ver sección 2.3.3.).

2.4.5. Análisis de la presencia de insertos en los clones

Todos los clones utilizados en esta tesis fueron analizados mediante digestiones con enzimas de restricción del DNA plasmidial para verificar presencia, identidad y en algunos casos orientación del inserto. Los clones de la colección MGC del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, fueron sembrados en placas de Petri LB-agar con ampicilina o cloranfenicol según el gen de resistencia que presentasen sus plásmidos. Al menos cinco colonias de cada clon fueron crecidas en medio LB líquido durante 16 h y se

les extrajo el DNA plasmidial, desde donde se hicieron las digestiones con nucleasas de restricción. Aquellos productos de amplificación que fueron clonados durante esta tesis en el vector pGEM -T Easy fueron digeridos sólo con la enzima *EcoR1*, mientras que la región codificadora del gen *ctr1* clonada en pTrcHis2 Topo TA fue digerido con *EcoRV*. Cada reacción de digestión se realizó con 1 µg de DNA incubado con 1 U de cada enzima por 2-12 h a 37 °C utilizando los buffer recomendados por los fabricantes de cada nucleasa. Los resultados de las digestiones fueron verificados en geles de agarosa mientras que los patrones de restricción fueron predichos teóricamente *in silico* utilizando el programa Primer Premier 5.0.

2.5. Hibridación en membranas de nylon.

2.5.1. Características de las membranas.

Los productos únicos de amplificación, fueron sintetizados como se indica en 2.4.1. y sembrados en membranas de nylon (GeneScreen Plus NEN ®) de 11 cm de largo por 7,5 cm de ancho. La siembra se llevó a cabo de manera automatizada mediante la estación robótica ChipWriter Compact System v1.2 (BioRad), la cual fue programada para establecer una distancia entre puntos de siembra de 1500 µm. La siembra se realizó utilizando 4 agujas sólidas (ArrayIt® modelo SSP015) cuyo diámetro de punto de siembra es de 600 µm. Cada producto de PCR fue sembrado dos veces en la membrana y en dos masas distintas, 5 ng (membranas Tipo I) y 0,5 ng (membranas Tipo II) por punto de siembra. Los productos de amplificación sembrados corresponden a tres tipos de controles: 1) Genes de expresión constitutiva: *actβ*, *tuba2* y *gpdh*, que permiten la comparación entre membranas. 2) Control heterólogo de la retrotranscripción: *dap* y 3) controles negativos: *rbcS* de *A. thaliana* y *CG6132* de *D.melanogaster*, con una identidad nucleotídica menor al 5 % comparados contra el genoma completo de *H. sapiens*. El resto de los productos de amplificación sembrados correspondieron a fragmentos de transcritos de genes que representaron preguntas en este estudio, los cuales se han vinculado al metabolismo de metales traza y defensa contra el daño oxidativo.

Las membranas sembradas fueron tratadas con una solución de desnaturación (0,5 M NaOH, 1,5 M de NaCl) durante 7 min y luego lavadas con agitación en una solución de neutralización (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris; 1 mM EDTA, pH 7,4) durante 3 min. Posteriormente las membranas fueron secadas y tratadas con luz UV durante 36 s en el equipo Ultraviolet Crosslink CL-1000. Todas las membranas fueron reutilizadas 2 veces, después de ser exhaustivamente lavadas en una solución de SDS 0,1 % v/v a 100 °C.

2.5.2. Marcación de sondas.

Los ensayos de hibridación fueron realizados utilizando sondas complejas. Para esto, se utilizaron 500 ng de mRNA purificados como se indicó en la sección 2.3.5. como sustrato en las reacciones de transcripción reversa, adicionándoles 2 ng de mRNA del gen *dap* como control heterólogo de la retrotranscripción. Para la reacción se usó una mezcla compuesta de 1,5 µg de oligo dT (Invitrogen) y 0,75 µg de hexámeros random primers (Invitrogen) como partidores. Cada reacción contuvo además 0,5 mM de dATP, dTTP, dGTP y dCTP. El mRNA se desnaturó a 70 °C durante 10 min y luego la temperatura se disminuyó progresivamente 5 °C cada 1 min hasta alcanzar 42 °C, momento en el cual se adicionó la mezcla buffer 1X (250mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂); 0,25 mM DTT (Invitrogen); 40 unidades de Rnasin® Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen) y 300 U de la enzima Superscript II RNase H- (Invitrogen), esta reacción se mantuvo durante 2 h a 42 °C. Luego la mezcla fue desnaturada a 70 °C por 15 min para inhibir la actividad de la enzima. A partir de este cDNA de hebra simple se sintetizó un cDNA de doble hebra como se describe en D'Alessio y Gerard, 1998. Para esto se mezclaron 0,5 mM de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 250 unidades/ml de DNA polimerasa I de *E. coli* (New England Biolab), 8,5 unidades/ml de RNasa H de *E. coli* (Invitrogen) y 10 unidades/ml de DNA ligasa de *E. coli* (New England Biolab), reacción que fue incubada durante 120 min a 16 °C. Posteriormente este cDNA fue purificado utilizando una mezcla de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1, precipitando con etanol 80 % v/v - acetato de sodio 3 M y luego resuspendido en 25 µl agua libre de

nucleasas. Finalmente, las sondas fueron marcadas radiactivamente utilizando el kit Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen), ocupando como sustrato el cDNA de doble hebra generado como se describió previamente. Para esto se incubó el cDNA junto con 15 µl de Random Primers Buffer Mixture, 0,01 mM de dATP, dGTP y dTTP, 50 mCi de [³²P] dCTP y 3 U de polimerasa Klenow. La reacción fue incubada a 25 °C durante 120 min. Las sondas sintetizadas fueron purificadas con el kit QIAquick Nucleotide Removal (QIAGEN) desnaturalizadas a 100 °C durante 10 min y utilizadas de inmediato.

2.5.3. Hibridación con sondas radioactivas.

Las membranas generadas como se describe en la sección 2.5.1. fueron pre-hibridadas durante 2 h a 42 °C en botellas de vidrio, con una solución de 5X SSC, 5X solución de Denhardt, 1X SDS, 50 % v/v formamida, 50 µg/ml de DNA de esperma de salmón (Invitrogen). Luego se agregó la sonda con una actividad específica promedio de $2,2 \times 10^6$ cpm/µg, previa desnaturalización a 100 °C durante 10 min. La hibridación se realizó a 42 °C durante 20 h, en todos los casos. Posteriormente las membranas fueron lavadas cuatro veces a 65 °C por 20 min con una solución 2 % v/v SSC, 0,1 % p/v SDS.

2.6. Análisis de datos.

2.6.1. Obtención de imágenes.

Las membranas hibridadas como se describe en la sección 2.5.3. fueron expuestas a pantallas de tipo BaFBr:Eu⁺² (imaging screen-K, BioRad) durante 96 h, siguiendo las condiciones reportadas por González-Agüero (González-Agüero y col., 2005). Las imágenes de las membranas hibridadas fueron obtenidas con el equipo Personal Molecular Imager FX (BioRad), utilizando el programa Quantity One 4.4.0 con una resolución de 50 µm por píxel.

2.6.2. Obtención de datos, análisis de calidad de la señal de hibridación y normalización.

La cuantificación de los valores de intensidad bruta y ruido local para cada punto de siembra, fue obtenida con el programa VersArray 4.5.1.46 (BioRad) mediante el uso de celdas de cuantificación de tamaño variable. La intensidad bruta de cada punto de siembra se determinó a partir del promedio de la intensidad de píxeles en toda el área de la celda. Como cada evento de hibridación cuenta con un ruido asociado a la técnica, se seleccionaron 24 puntos al azar en zonas de la membrana donde no hubo siembra de productos de amplificación y se calculó el promedio del ruido local de estos puntos, el cual fue restado a cada valor de señal bruta de hibridación para obtener valores netos, los cuales fueron utilizadas en los análisis de expresión génica. Un ejemplo de la zona en donde se fijó la grilla de los 24 puntos señalados se representa gráficamente por el área que comprende el rectángulo de líneas segmentadas de la membrana "control" de la figura 15.

Para asegurar la calidad de las señales de hibridación empleadas en los análisis de expresión génica se utilizó un procedimiento que consta de dos criterios principales, 1) un valor umbral por sobre el cual la señal neta es confiable y 2) eliminación de señales contaminadas por señales vecinas, identificadas por inspección visual. Para cada membrana se utilizó como valor umbral el promedio de los ruidos locales asociados a las señales de los 24 puntos de regiones no sembradas, más cinco veces su desviación estándar. Todas aquellas señales netas asociadas a puntos de siembra que superaron este valor umbral fueron consideradas confiables, puesto que este valor aseguró la eliminación del 93 -100 % de todas las señales asociadas a regiones de no siembra en todas las membranas analizadas.

Los ensayos de hibridación se realizaron utilizando tres réplicas biológicas para cada tratamiento y sus controles. Como cada ensayo tenía una réplica experimental (debido a que el producto de PCR fue sembrado dos veces en cada membrana), cada gen entregó seis señales de hibridación, tanto en las membranas Tipo I como en las Tipo

II. Estos valores fueron normalizados respecto de la señal neta de hibridación de *actβ*, obteniéndose finalmente valores promedios que corresponden a la razón entre la intensidad neta de cada señal y la intensidad neta de *actβ* en su membrana, en sextuplicado. Este proceso de normalización permitió la comparación entre membranas sembradas con la misma masa de productos de PCR.

Los análisis de cambios transcripcionales de los genes sembrados se determinaron estimando la razón entre el valor de las señales netas de hibridación normalizadas de los tratamientos versus el valor de las señales netas de hibridación normalizadas de los controles. Por este motivo, el análisis de abundancia relativa se realizó con aquellos genes que poseían señal tanto en los controles como en los tratamientos, lo que corresponde a un subconjunto de las señales recuperadas luego de aplicar los filtros de identificación de señales confiables. Finalmente, se evaluó la reproducibilidad de los ensayos de hibridación realizados determinando el grado de agregación y correlación de las señales netas de hibridación entre réplicas experimentales.

2.7. Bases de datos, herramientas bioinformáticas y análisis estadístico.

La información relacionada con las secuencias nucleotídicas o aminoacídicas de los 44 genes utilizados durante esta tesis, fue obtenida desde las bases de datos del Centro Nacional de Información para la Biotecnología (NCBI) del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La secuencia de los vectores utilizados fue obtenida desde la base de datos de la Colección de Genes de Mamíferos (MGC) del NCBI o desde el Centro Alemán de Recursos para la Genómica, GmbH (www.rzpd.de). Los alineamientos entre secuencias fueron realizados con la herramienta BLAST del NCBI o por ClustalW del Instituto Europeo de Bioinformática. Los datos fueron analizados por pruebas estadísticas de t de Student utilizando el programa SYSTAT 9.0 y/o Excel. Las diferencias fueron consideradas significativas con $P < 0,05$.

RESULTADOS

Actualmente, se sabe que existe un estrecho vínculo entre el metabolismo celular de Cu, Fe y Zn. Sin embargo, existe escasa información que ayude a comprender cómo se relacionan las rutas asociadas con el metabolismo de estos metales y si la relación de contenido que existe entre ellos puede dar cuenta de la regulación transcripcional dirigida a mantener su homeostasis. Con el objetivo de comprender estos aspectos, células HepG2 fueron expuestas a: I) una concentración supra-fisiológica de Cu (suplementando el medio de cultivo basal con 100 μ M de Cu:His) durante cinco periodos de tiempo (0, 8, 12, 24 y 48 h), o II) un medio de cultivo basal con baja disponibilidad de Fe (suplementado con 100 μ M del quelante de Fe, DFO) durante un periodo de 48 h. Estos tratamientos y sus controles se muestran esquematizados en la figura 1.

Con el propósito de comparar los resultados obtenidos en los experimentos utilizando células HepG2, células Caco-2 fueron sometidas a idénticos tratamientos lo que permitió detectar variaciones específicas del tipo celular. Los periodos de pre-tratamiento fueron distintos entre líneas celulares, donde las células HepG2 se mantuvieron durante 4 días hasta alcanzar un 80 % de confluencia mientras que células Caco-2 se mantuvieron por 17 días en post-confluencia antes de tratarlas con Cu:His o DFO. Este diseño permite evitar cambios transcripcionales de genes relacionados con el metabolismo de Cu y Fe como respuesta al proceso de diferenciación celular en Caco-2 (Han y Wessling-Resnick, 2002; Bedrine-Ferran y col., 2004) los cuales podrían interferir en las conclusiones orientadas a determinar cambios de abundancia relativa de estos genes asociados a los tratamientos con Cu:His o DFO. Adicionalmente, el tiempo de cultivo durante el periodo de tratamientos se mantuvo constante (48 h) para todas las muestras tratadas y sus controles (células no expuestas a Cu:His o DFO) tanto en células Caco-2 como en HepG2. Bajo estas condiciones experimentales (Figura 1) las células tratadas y sus controles fueron utilizadas para: 1) cuantificar el contenido intracelular de Cu, Fe y Zn, 2) determinar viabilidad celular, 3) determinar los niveles de acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), 4)

determinar la distribución y abundancia relativa de la proteína MT y 5) cuantificar la abundancia relativa de transcritos asociados al metabolismo de Cu, Fe, Zn y defensa contra el daño oxidativo.

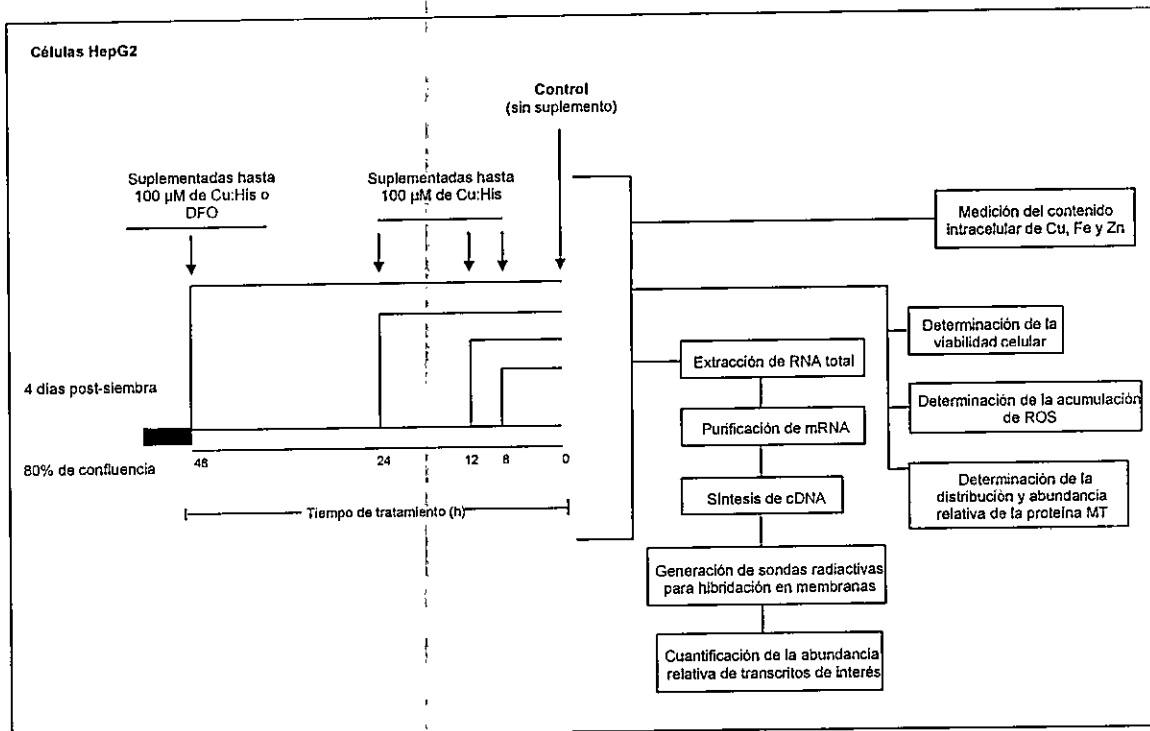


Figura 1. Esquema de los tratamientos con Cu:His o DFO en células HepG2. El esquema representa la estrategia experimental utilizada en este trabajo, indicando los tiempos de exposición de células HepG2 al medio basal de cultivo suplementado con 100 μ M de Cu:His o DFO (indicado por las flechas) y sus controles. Para cada uno de los tratamientos, el tiempo total de cultivo se mantuvo constante (48 h). De los tratamientos y sus controles, se tomaron alícuotas que fueron utilizadas para determinar el contenido intracelular de Cu, Fe y Zn, la viabilidad celular, la acumulación de ROS y la distribución y abundancia de MT. Además se cuantificó la abundancia relativa de transcritos asociados al metabolismo de Cu, Fe, Zn y defensa contra el daño oxidativo.

1. Determinación del contenido intracelular de metales y de la viabilidad celular en células HepG2 y Caco-2 expuestas a una concentración supra-fisiológica de Cu.

1.1. Medición del contenido intracelular de cobre, hierro y zinc.

En humanos la concentración de Fe en el plasma es de 8-12 μM (Yip y col., 1984), mientras que la de Cu es de 15-20 μM (Linder y col., 1998). Del contenido total de Cu, aproximadamente un 90 % se encuentra unido a ceruloplasmina (Cu-cp) y el 10 % restante unido a albúmina o a algún aminoácido como glicina o histidina (Cu-nocp), el cual es considerado como la fracción disponible para la utilización celular. Entonces, en condiciones fisiológicas el Cu-nocp en el plasma (1,5-2 μM) es aproximadamente cinco veces mayor que la concentración de Cu en el medio de cultivo utilizado durante este estudio (0,4 μM), razón por la cual, la concentración basal de Cu en el medio de cultivo fue considerada como sub-fisiológica, mientras que la concentración en el medio suplementado con 100 μM de Cu:His fue considerada como supra-fisiológica, siendo aproximadamente cincuenta veces mayor que la concentración plasmática de Cu-nocp.

El análisis del contenido intracelular de metales vía espectrometría de absorción atómica indicó que la concentración de Cu aumentó en ambas líneas celulares en función del tiempo de exposición al metal, sin embargo, éste fue más acentuado en células HepG2 que en Caco-2, detectándose incrementos significativos en el contenido de Cu a partir de las 8 h de exposición, mientras que en Caco-2 estos incrementos se observaron sólo a partir de las 24 h (Figura 2A). El análisis de los datos indica que aunque ambos tipos celulares alcanzaron contenidos similares de Cu al finalizar los periodos de tratamientos, la capacidad de carga de Cu (definida como la razón de contenido intracelular de Cu entre células expuestas y las células no expuestas al metal) es significativamente mayor en células HepG2 que en Caco-2 para todos los tiempos analizados ($P < 0,05$) (Figura 2B). Así por ejemplo, a las 48 h de exposición con Cu:His las células HepG2 incrementaron 19,2 veces la carga celular de Cu (de 0,53 a 10,2 nmoles Cu/mg de proteínas), mientras que en células

Caco-2 el aumento fue sólo de 6,5 veces para igual tiempo de exposición (de 1,1 a 7,1 nmoles Cu/mg de proteínas). La diferencia observada en la cinética de almacenamiento de Cu sugiere que cada tipo celular ajusta de distinta forma el proceso de entrada y salida del metal, posiblemente asociado a su particular compromiso fisiológico.

Bajo las mismas condiciones experimentales antes descritas, se midió el contenido intracelular de Fe y Zn. Los datos indican que en ambas líneas celulares el contenido intracelular de Fe disminuye en forma significativa en función del tiempo de exposición a Cu:His, respecto de las células no expuestas al metal (Figura 2C). En HepG2 y en Caco-2 esta disminución es significativa ($P < 0,05$) a partir de las 8 h y 12 h de exposición respectivamente, tendencia que se mantiene hasta los periodos más largos de tratamiento. Al comparar la disminución en la carga de Fe no se detectaron diferencias entre líneas celulares en ninguno de los tiempos de exposición (datos no mostrados). Por su parte, en ambos tipos celulares el contenido intracelular de Zn se mostró invariable en todos los tiempos de exposición a Cu:His respecto al control (Figura 2D). En resumen, estos datos indican que la exposición a Cu:His se correlaciona con un aumento en el contenido intracelular de Cu, una disminución en el contenido de Fe y un efecto nulo sobre el contenido de Zn, junto con diferencias en la capacidad de carga de Cu entre líneas celulares. Sin embargo, aunque algunos efectos parezcan poco relevantes desde el punto de vista de las variaciones de contenido de un metal en particular, las razones que se establecen entre los metales en cuestión (Cu/Fe, Cu/Zn, Fe/Zn) siempre se vieron afectadas en células suplementadas respecto de aquellas que no lo fueron, aspecto que será posteriormente evaluado con más detalle.

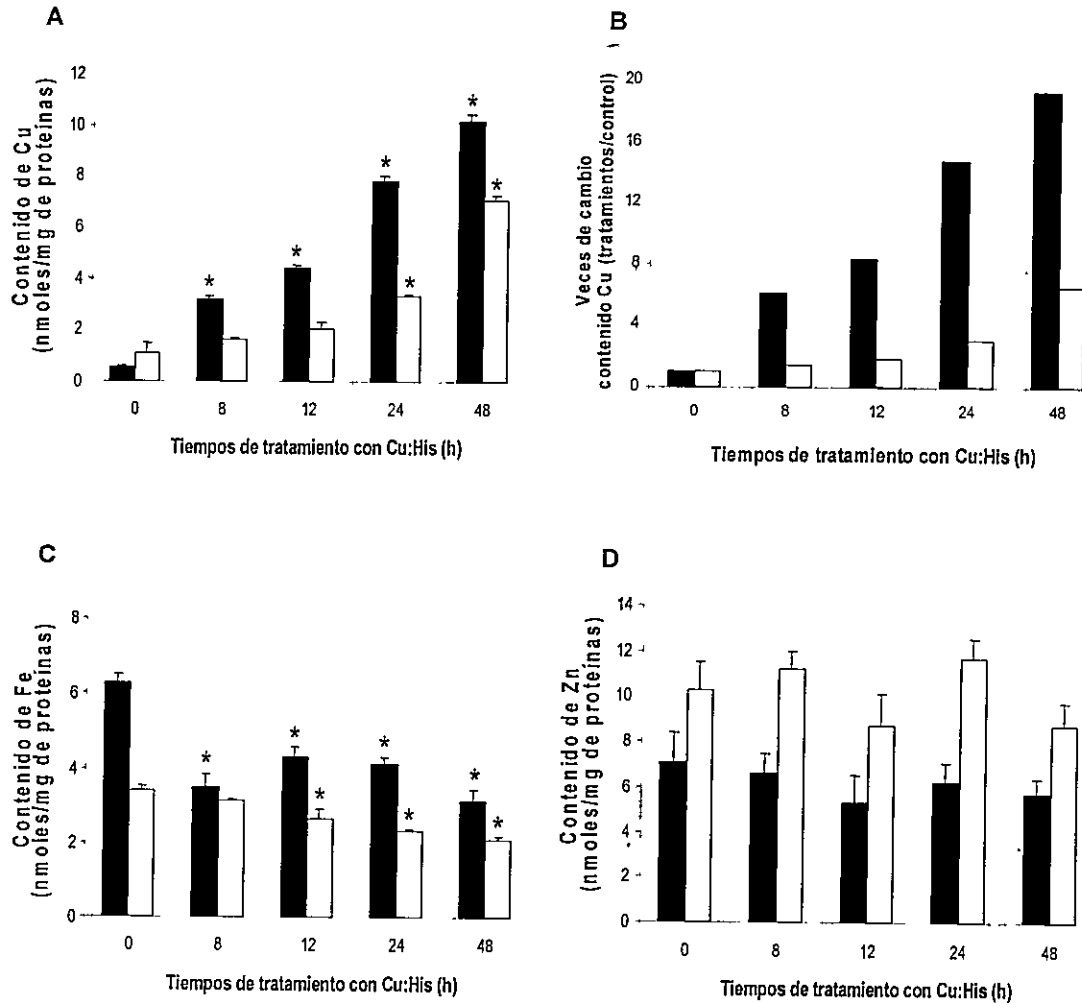


Figura 2. Medición del contenido intracelular de Cu, Fe y Zn en células HepG2 y Caco-2 expuestas a Cu:His. A) Contenido intracelular de Cu para células HepG2 y Caco-2 para tiempos variables de exposición a Cu:His. B) Veces de cambio de contenido intracelular de Cu en células expuestas Cu:His respecto del contenido de Cu en células control (no expuestas al metal, representado como 0 h de tratamiento con Cu:His). En C) y D) Contenido intracelular de Fe y Zn respectivamente, en células HepG2 y Caco-2 expuestas a Cu:His. Las barras negras representan el contenido de metales en células HepG2 y las barras blancas en Caco-2. El contenido de cada metal fue normalizado por el contenido de proteínas en cada muestra y cada valor corresponde al promedio de tres réplicas biológicas con su respectivo error estándar. Los análisis de significancia estadística se realizaron comparando los datos provenientes de células controles y tratadas, mediante una prueba t de Student, (* $P < 0,05$).

1.2. Análisis de la viabilidad celular.

La viabilidad de las células expuestas a Cu:His fue cuantificada mediante ensayos de reducción de MTT. Los valores de reducción fueron expresados en porcentaje de actividad, siendo el 100 % la actividad de reducción de MTT medida en las células no expuestas a Cu:His para cada línea celular. En la figura 3 se observa que en ambas líneas celulares se produjo una leve pero significativa disminución (<15 %) del nivel de reducción de MTT a partir de las 8 h de exposición para HepG2 y de las 24 h para Caco2. Un resultado similar se obtuvo al evaluar la viabilidad a partir del recuento de células mediante ensayos de exclusión con azul tripán (datos no mostrados). Estos datos nos permiten descartar diferencias de viabilidad entre ambos tipos celulares para los tiempos de tratamiento y concentración de cobre que fueron utilizados en el análisis de abundancia de transcritos.

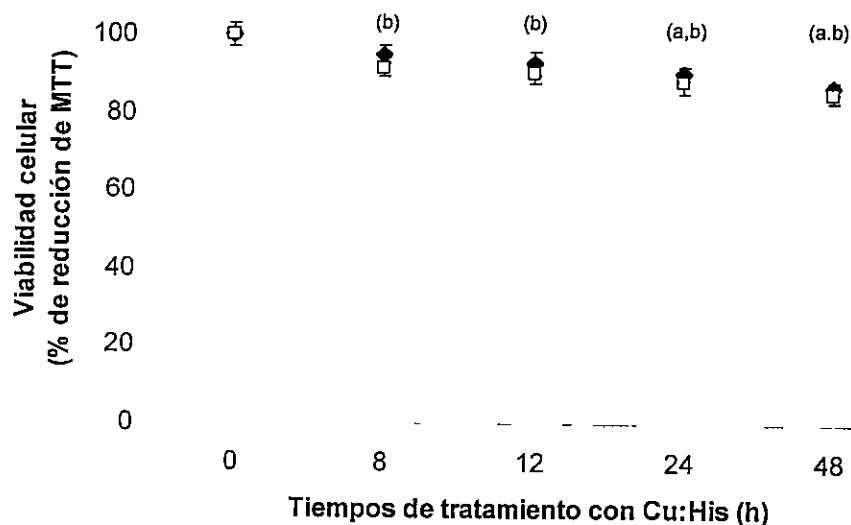


Figura 3. Determinación de la viabilidad celular en células HepG2 y Caco-2 expuestas a Cu:His. La viabilidad celular fue medida mediante un ensayo de MTT para ambas líneas celulares. Los rombos negros representan los datos obtenidos con células HepG2, mientras que los cuadros blancos representan datos provenientes de células Caco-2. Los valores promedio determinados para tres réplicas biológicas se grafican en función del tiempo de exposición a Cu:His. Las barras corresponden al error estándar; (a): $P < 0,05$ para HepG2, (b): $P < 0,05$ para Caco-2, para los tratamientos versus los controles (prueba t de Student).

El análisis de los datos mostrados en los puntos 1.1. y 1.2. nos permiten observar una correlación esperada entre el aumento en el contenido de Cu intracelular y una disminución de la viabilidad celular, probablemente mediado por un aumento en la abundancia de ROS. Por otra parte, el suplemento de Cu:His generó un aumento en el contenido intracelular de Cu lo cual se asoció con la disminución del contenido intracelular de Fe. Este efecto dual interfiere en la interpretación de resultados que se pueden establecer entre el contenido de un metal en particular y los cambios de abundancias relativas de transcritos vinculados a su metabolismo. Por esta razón, se estimó conveniente disminuir el contenido intracelular de Fe mediante un procedimiento experimental alternativo al utilizado (medio suplementado con Cu:His), lo cual permitiría asociar cambios de abundancia de transcritos en forma específica con la disminución de Fe y además acceder a modificaciones alternativas de relaciones de contenido entre Cu, Fe y Zn de las que se establecen con el tratamiento con Cu:His.

Con este objetivo, células HepG2 y Caco-2 fueron expuestas a 100 μ M de DFO por 48 h, condición que disminuyó el contenido intracelular de Fe a valores similares a los alcanzados con el suplemento de 100 μ M Cu:His durante 24 y 48 h respectivamente (Figuras 4 y 7). De esta forma, células expuestas a las concentraciones y tiempos de tratamientos señalados y sus controles fueron utilizados para realizar los análisis de expresión génica.

2. Efecto del suplemento de Cu:His o DFO sobre células HepG2.

2.1. Análisis del contenido de metales.

La cuantificación del contenido de metales reveló que tanto células HepG2 expuestas a Cu:His durante 24 h (Figura 4A) como aquellas expuestas durante 48 h con DFO (Figura 4B) mostraron un aumento en el contenido intracelular de Cu, una disminución en el contenido de Fe y un contenido invariable de Zn en relación a las células no tratadas. Aunque ambos tratamientos mostraron las mismas tendencias, los datos indican que la

exposición a Cu:His se correlacionó con una razón de aumento de 14,7 en el contenido intracelular de Cu (de 0,53 a 7,8 nmoles Cu/mg de proteínas entre control y tratadas, respectivamente) mientras que el tratamiento con DFO lo hizo en una razón de aumento de 2,1 (de 0,53 a 1,1 nmoles Cu/mg de proteínas). Por otra parte, el contenido de Fe disminuyó en una razón de 0,7 (de 6,3 a 4,1 nmoles Fe/mg de proteínas) en células suplementadas con Cu:His y también en razón de 0,7 (de 6,3 a 4,3 nmoles Fe/mg de proteínas) en células expuestas con DFO, lo que indica que efectivamente nuestra estrategia permitió alcanzar un contenido intracelular de Fe similar al alcanzado con el suplemento de Cu:His.

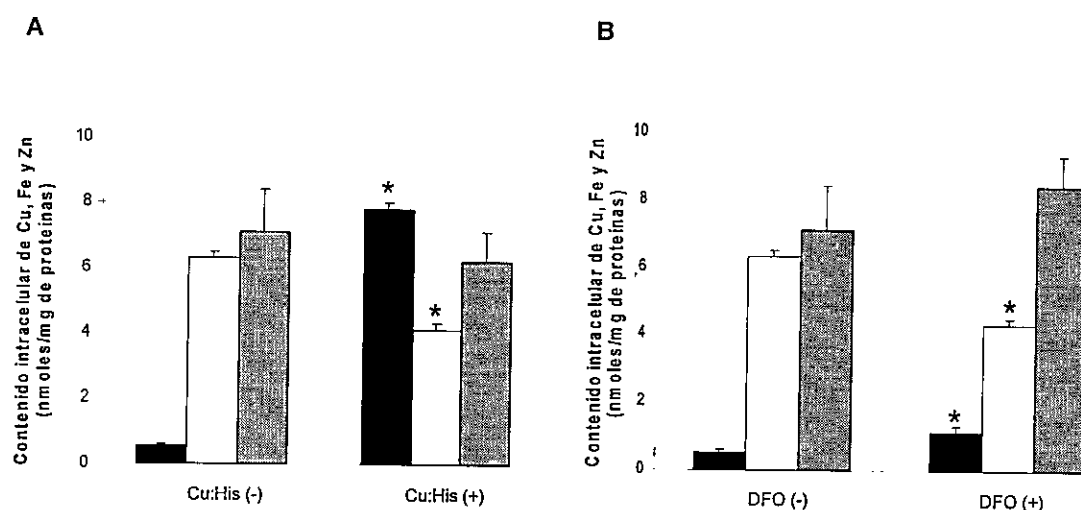


Figura 4. Medición del contenido intracelular de Cu, Fe y Zn en células HepG2 no expuestas o expuestas a Cu:His o DFO. Los gráficos muestran el resultado de la medición del contenido intracelular de Cu (barras negras), Fe (barras blancas) y Zn (barras grises) en células suplementadas con 100 μ M de Cu:His durante 24 h [Cu:His (+)] o no suplementadas [Cu:His (-)] (A). En (B) el contenido intracelular de Cu, Fe y Zn en células expuestas a 100 μ M de DFO durante 48 h [DFO (+)] o no expuestas [DFO (-)]. En cada muestra, el contenido intracelular de metales fue normalizado por su contenido de proteínas totales y cada barra representa el promedio de tres réplicas biológicas con su respectivo error estándar. Los análisis de significancia estadística se realizaron comparando el contenido de cada metal en la condición de tratamientos (+) versus la condición control (-) mediante una prueba t de Student, (*P<0,05).

El análisis de las relaciones de abundancia entre metales traza (Cu/Fe, Cu/Zn y Fe/Zn) permitió establecer que estas se ven modificadas al comparar el contenido intracelular en células tratadas y sus controles, como también al comparar entre tratamientos (Cu:His y DFO). El detalle de estas diferencias, para los tiempos de tratamiento indicados se muestra en la Tabla 3. La relación Cu/Fe se vio incrementada tanto con la exposición a Cu:His como con DFO respecto al control, lo que se explica por el efecto conjunto entre el aumento en el contenido intracelular de Cu y la disminución en el contenido de Fe. A pesar de mantener esta tendencia entre tratamientos, se puede observar que la razón es mayor en las células tratadas con Cu:His que con DFO lo cual se explica, no por la disminución en el contenido de Fe, que es similar con ambos tratamientos, sino que por un aumento significativamente mayor en el contenido de Cu en el primer caso (con Cu:His). Por su parte, la relación Cu/Zn también mostró un incremento con ambos tratamientos respecto a la condición control, siendo mayor la razón en las muestras tratadas con Cu:His que con DFO, lo que también se explica por el considerable aumento en el contenido de Cu más que por diferencias en el promedio del contenido de Zn. Finalmente, la razón Fe/Zn muestra leves diferencias tendientes a la baja, comparando muestras tratadas y sus controles, lo cual se explica por la disminución en el contenido intracelular de Fe con ambos tratamientos. Comparando entre tratamientos, esta razón se mantiene prácticamente invariable lo que está dado por similares contenidos de Fe y Zn en las muestras tratadas durante los tiempos señalados.

Estos resultados permiten establecer que ambos tratamientos modifican los contenidos intracelulares de Cu y Fe, sin modificar los de Zn respecto a sus controles. Estas modificaciones trascienden en cambios en las relaciones de abundancia relativa entre metales, lo que se evidencia al comparar las razones de contenido tanto entre los tratamientos y controles como entre tratamientos. El énfasis de estos efectos reside en que las células sometidas a variaciones en la disponibilidad de Cu, no sólo deben adaptarse a las variaciones intracelulares del propio metal, sino que también a las consecuentes variaciones de otros metales traza. Por esto, aunque el contenido absoluto de un metal en

particular se mantenga constante en células tratadas y sus controles (como fue el caso del Zn) o entre células tratadas con Cu:His o DFO (como fue el caso de Fe), las variaciones en las relaciones de contenido relativo entre metales pueden ser relevantes respecto a lo que las células pueden percibir como estatus intracelular de metales en alguna condición particular, lo cual podría influir en términos de la respuesta a nivel transcripcional. Este aspecto será evaluado posteriormente.

Tabla 3. Relaciones de abundancia entre metales en células HepG2. La tabla muestra la razón entre el contenido intracelular de Cu y Fe, Cu y Zn o Fe y Zn detectados en células HepG2 suplementadas con 100 μ M de Cu:His durante 24 h o expuestas a 100 μ M de DFO durante 48 h y sus controles. Las razones señaladas se calcularon a partir de valores promedios de contenido intracelular de metales provenientes de tres réplicas biológicas.

Tratamiento \ Razón	Cu/Fe	Cu/Zn	Fe/Zn
Control	0,08	0,07	0,89
Cu:His (24 h)	1,9	1,26	0,66
DFO (48 h)	0,26	0,13	0,51

2.2. Determinación de la acumulación de ROS y de la viabilidad celular.

La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), fue estimada a través de la cuantificación de la fluorescencia emitida por el reactivo H2DCF-DA. Los datos que se muestran en la figura 5A y 5B indican que las células HepG2 suplementadas con Cu:His o expuestas a DFO mostraron un aumento significativo en la fluorescencia emitida por H2DCF-DA en relación a las células que no recibieron tratamientos, lo que permite inferir un aumento en la acumulación de ROS. A pesar de mantener esta tendencia entre tratamientos, la magnitud de la acumulación de ROS es mayor en células expuestas a DFO que suplementadas con Cu:His. Este dato resultó interesante puesto que el esperado era el inverso, asumiendo que un mayor contenido intracelular de Cu produciría una mayor producción de ROS. Para abordar este punto se estimó conveniente determinar el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular, la cual fue determinada de forma indirecta mediante ensayos de reducción de MTT. Los datos que se muestran en la figura 5C y 5D indican que las células expuestas a Cu:His o expuestas a DFO mostraron una disminución significativa en la reducción de MTT en relación a las células que no recibieron tratamientos, lo que se puede traducir en que la población celular vio disminuida su viabilidad con ambos tratamientos. A pesar de que entre tratamientos esta tendencia es la misma, la magnitud en la disminución de la viabilidad se hace mucho más acentuada con el tratamiento con DFO (que alcanza un 46 % respecto a las células control) que con el suplemento de Cu:His (que alcanza un 9,8 % respecto a las células control). Similares resultados fueron obtenidos calculando la viabilidad celular a partir del recuento de células por ensayos de exclusión con azul tripán (datos no mostrados). Por lo tanto, con ambos tratamientos un aumento en la acumulación de ROS se correlacionó con una disminución en la viabilidad celular, no obstante, al indagar en los vínculos entre estos aspectos celulares y la magnitud de acumulación de Cu entre los tratamientos, se mantuvo la interrogante de cómo un menor contenido intracelular de Cu da cuenta de un mayor efecto sobre la viabilidad en las células tratados con DFO que en las expuestas a Cu:His. Esto planteó la posibilidad de un algún efecto particular del DFO sobre la viabilidad en células HepG2 (ver discusión).

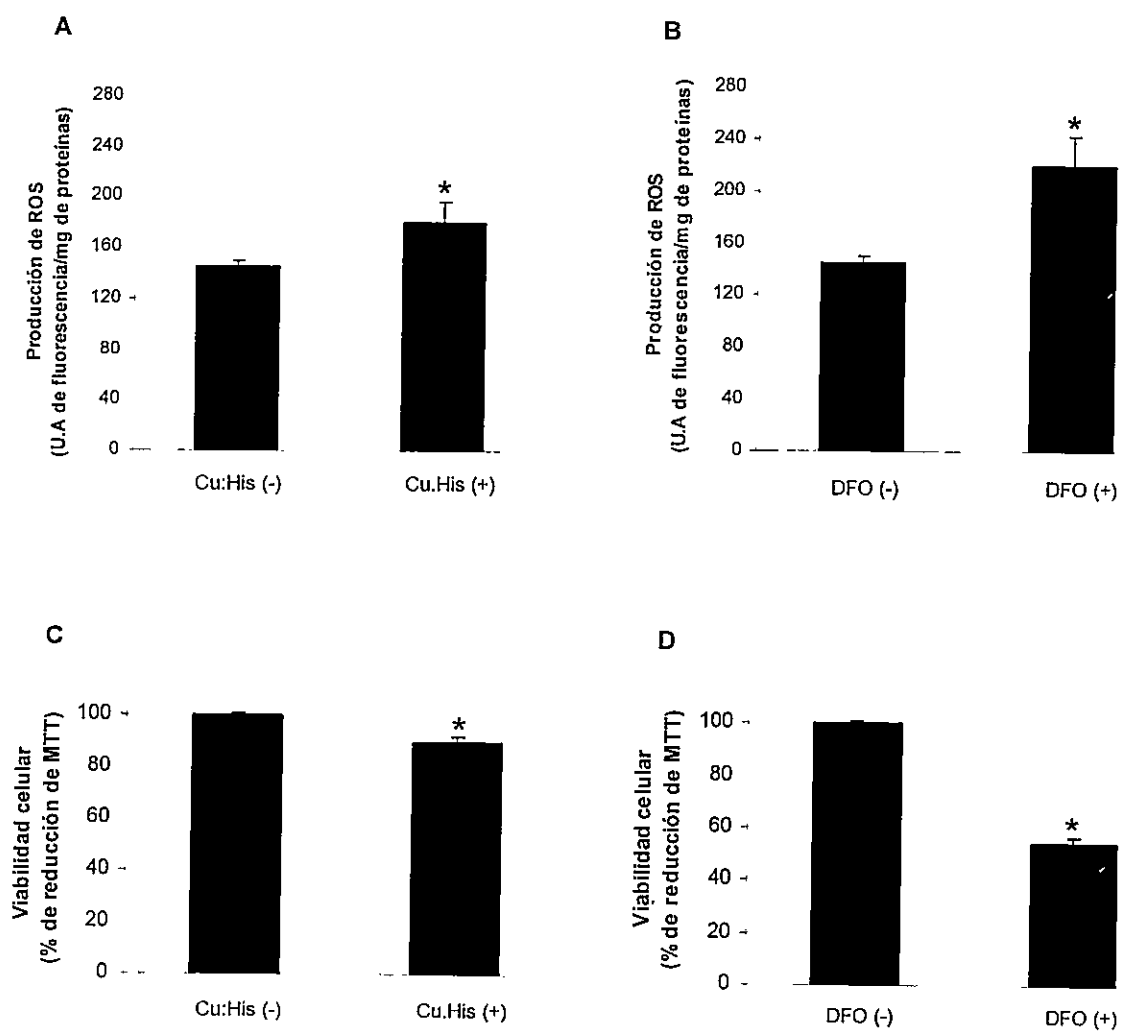


Figura 5. Determinación de la acumulación de ROS y de la viabilidad en células HepG2 expuestas a Cu:His o DFO. La acumulación de ROS se estimó mediante ensayos de oxidación de H2DCF-DA (A y B) y la viabilidad celular mediante ensayos de reducción de MTT (C y D). Cada barra representa el promedio de tres réplicas biológicas con su respectivo error estándar. En todos los casos los análisis de significancia se realizaron mediante una prueba t de Student (*P<0,05), comparando los datos provenientes de células suplementadas con 100 μ M de Cu:His durante 24 h [Cu:His (+)] versus células no suplementadas [Cu:His (-)] o entre células expuestas a 100 μ M de DFO durante 48 h [DFO (+)] y células no expuestas [DFO (-)].

2.3. Determinación de la abundancia relativa del transcrito *mt* y de la proteína metalotioneína (MT) en células HepG2.

Varias líneas de evidencia han mostrado que el contenido intracelular de la proteína MT se correlaciona directamente con la resistencia a la exposición a Cu en levaduras, cultivos celulares de mamíferos y ratones (Thiele y col., 1986; Kawai y col., 2000; y Tapia y col., 2004). Como este estudio estuvo enfocado en determinar los efectos del suplemento de Cu sobre la expresión de algunos genes vinculados al metabolismo de metales, se cuantificó la abundancia relativa del transcrito *mt*, que codifica para la proteína MT, mediante PCR cuantitativo en tiempo real para verificar si las condiciones experimentales utilizadas estaban ejerciendo efectos a nivel transcripcional. Los datos de la figura 6 indican un aumento significativo en la abundancia del transcrito al comparar las células HepG2 tratadas con Cu:His o DFO con sus controles (6A y 6B, respectivamente), lo cual estuvo acorde con lo esperado. Adicionalmente, se determinó la capacidad de inducción de la proteína MT y su localización subcelular en HepG2 para los tratamientos respecto de sus controles mediante ensayos de IFI. Para esto, se cuantificó la intensidad de la señal inmuno-reactiva asociada a la exposición a Cu:His o DFO y su control a partir de nueve imágenes (como las de la figura 6C y 6D) obtenidas bajo microscopia de fluorescencia, las que fueron en todos los casos representativas de la población celular. Luego de la cuantificación de la señal fluorescente se utilizaron unidades densitométricas (unidades energéticas/píxel) para representar la abundancia de MT, como se muestra en los gráficos de barra adjuntos a las imágenes señaladas. El resultado del análisis indicó que, en células HepG2 sometidas al suplemento con Cu:His o DFO, el nivel de la señal inmuno-reactiva asociada a MT aumentó en una razón de 3,1 (de 42 a 129 unidades energéticas/píxel) y 2,9 (de 42 a 120 unidades energéticas/píxel) respectivamente, con respecto a la señal asociada a células control, lo cual se correlacionó en ambos tratamientos con los datos de aumento del transcrito *mt*. Por otra parte, los datos indican que MT se distribuye tanto en el citosol como en la zona nuclear de células controles y expuestas a Cu:His o DFO, (Figura 6C y 6D, respectivamente), sin embargo su patrón de distribución se vio alterado, mostrando una mayor intensidad de

fluorescencia en la zona nuclear de células tratadas (tanto con Cu:His como con DFO) que en sus controles. Los efectos tanto en la abundancia como en la distribución de MT no se observaron en otros componentes celulares como la proteína Actina (Act), lo que sugiere que los tratamientos produjeron efectos específicos sobre MT.

En resumen, el conjunto de los datos hasta ahora presentados indican que la exposición a Cu:His o DFO fue capaz de modificar el contenido intracelular de Cu y Fe, no así el de Zn y también las relaciones de contenido que se establecen entre ellos. Además, el aumento del contenido intracelular de Cu se correlacionó con un aumento en la producción de ROS, una disminución en la viabilidad celular y un cambio de distribución subcelular de MT, así como también con un aumento en la abundancia relativa del transcrito *mt* y de la proteína para la que codifica.

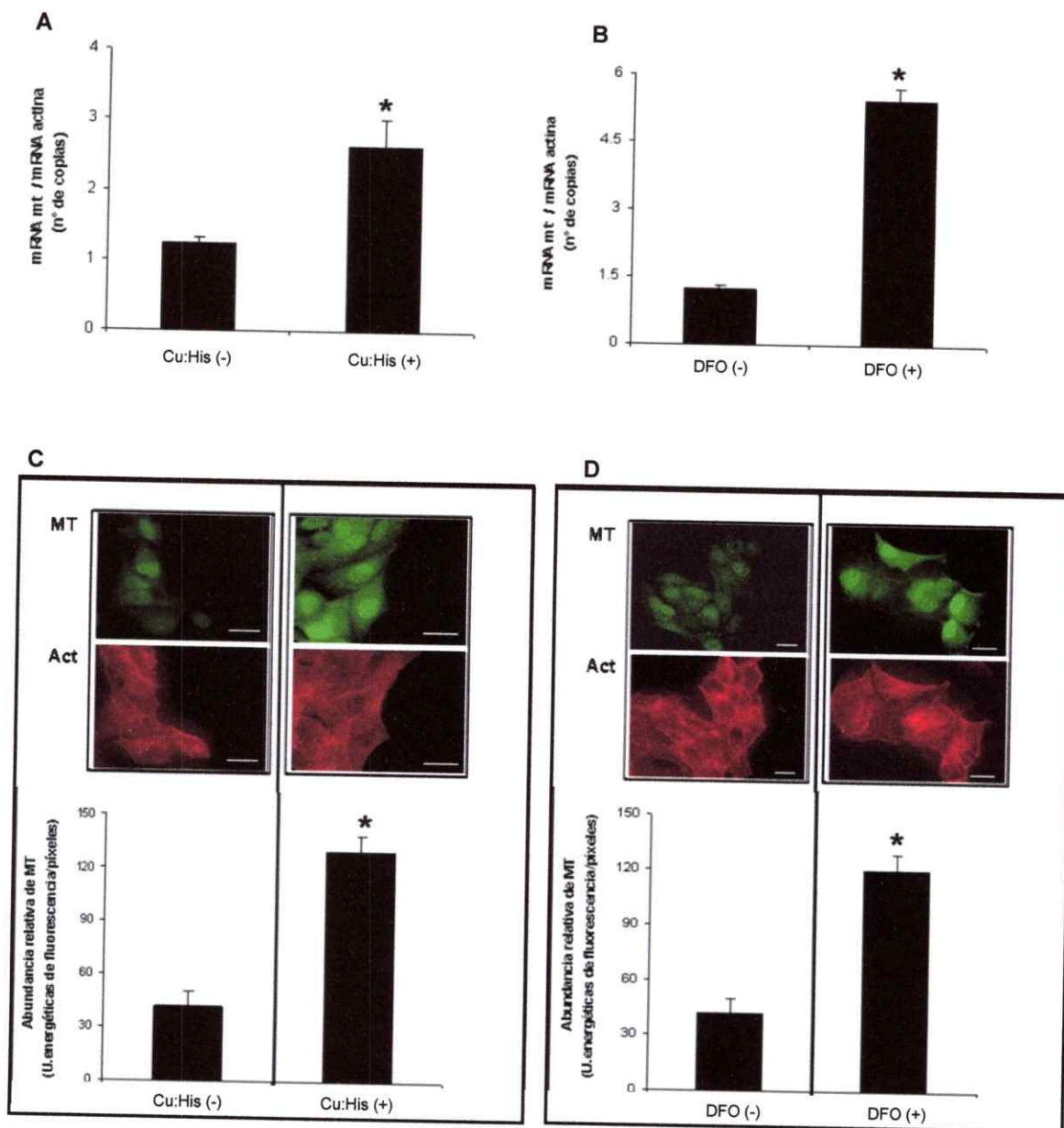


Figura 6. Determinación de la abundancia relativa del transcrito (*mt*) y de la proteína metalotioneína (MT) en células HepG2 expuestas a Cu:His o DFO. Se cuantificó la abundancia del transcrito *mt* por PCR en tiempo real (panel superior) y la abundancia de la proteína (MT) mediante Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (panel inferior). En todos los casos se compararon los datos provenientes de células suplementadas con 100 μ M de Cu:His durante 24 h [Cu:His (+)] versus células no suplementadas [Cu:His (-)] (A y C) o entre células expuestas a 100 μ M de DFO durante 48 h [DFO (+)] y células no expuestas [DFO (-)] (B y D). Las barras correspondientes a la cuantificación del transcrito de *mt* representan el promedio de tres réplicas biológicas normalizadas por la abundancia del transcrito *act β* . Las barras correspondientes a la abundancia de MT representan el promedio de intensidad de la señal inmunoreactiva asociada a MT, determinada por análisis densitométrico a partir de nueve fotografías como las que se muestran adjuntas (MT en verde y Actina en rojo). En cada fotografía, la barra blanca representa una longitud de 10 μ m. Los análisis de significancia estadística se realizaron mediante una prueba t de Student, (* $P < 0,05$).

3. Efecto del suplemento de Cu:His o DFO sobre células Caco-2.

3.1. Análisis del contenido de metales.

La cuantificación del contenido de metales reveló que tanto células Caco-2 expuestas a Cu:His durante 48 h (Figura 7A) como aquellas expuestas durante 48 h con DFO (Figura 7B) aumentaron su contenido intracelular de Cu, en menor magnitud que en células HepG2, disminuyeron el contenido de Fe y no mostraron diferencias en el contenido de Zn, en relación a las células no tratadas, lo que indica que tanto en células Caco-2 como HepG2 los tratamientos producen idénticas tendencias que varían sólo en sus magnitudes. De esta forma, los datos indican que la exposición a Cu:His se correlaciona con una razón de aumento de 6,5 en el contenido intracelular de Cu (de 1,1 a 7,1 nmoles Cu/mg de proteínas entre control y tratadas respectivamente), mientras que el tratamiento con DFO produjo el mismo efecto aunque sólo en una razón de aumento de 2,1 (de 1,1 a 2,3 nmoles Cu/mg de proteínas), alcanzando la misma magnitud en la razón de cambio que produjo el quelante de Fe en células HepG2. Por otra parte, el contenido de Fe disminuyó en una razón de 0,6 (de 3,4 a 2,1 nmoles Fe/mg de proteínas) en células Caco-2 suplementadas con Cu:His, razón similar a la observada en células HepG2. Las células Caco-2 expuestas a DFO mostraron una disminución de Fe en una razón de 1,5 (de 3,3 a 2,2 nmoles Fe/mg de proteínas), siendo este decremento el doble del alcanzado en células HepG2. Estos datos indican que el quelante logró el propósito de hacer menos disponible el Fe extracelular hasta alcanzar un contenido intracelular de Fe similar al alcanzado con el suplemento de Cu:His en Caco-2

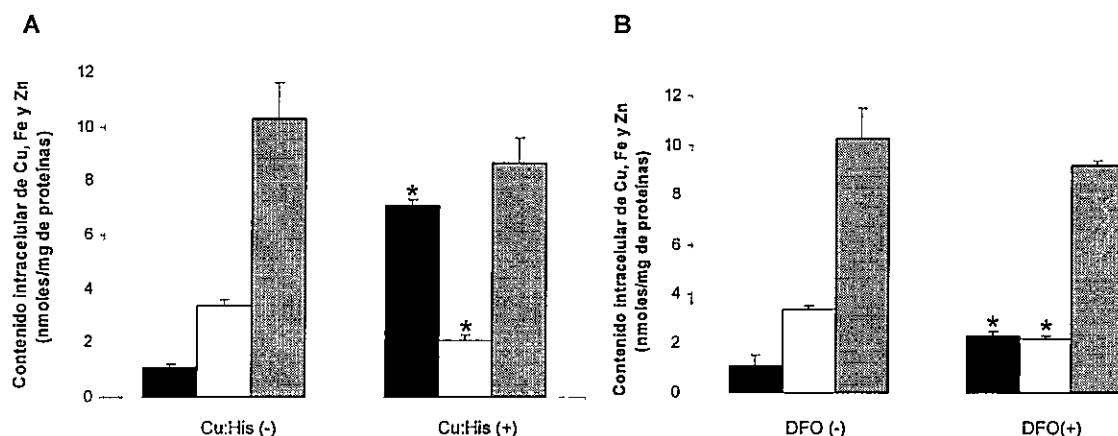


Figura 7. Medición del contenido intracelular de Cu, Fe y Zn en células Caco-2 no expuestas o expuestas a Cu:His o DFO. Los gráficos muestran el resultado de la medición del contenido intracelular de Cu (barras negras), Fe (barras blancas) y Zn (barras grises) en células suplementadas con 100 μ M de Cu:His durante 48 h [Cu:His (+)] o no suplementadas [Cu:His (-)] en (A). En (B) el contenido intracelular de Cu, Fe y Zn en células expuestas a 100 μ M de DFO durante 48 h [DFO (+)] o no expuestas [DFO (-)]. En cada muestra, el contenido intracelular de metales fue normalizado por su contenido de proteínas totales y cada barra representa el promedio de tres réplicas biológicas con su respectivo error estándar. Los análisis de significancia estadística se realizaron comparando el contenido de cada metal en la condición de tratamientos (+) versus la condición control (-) mediante una prueba t de Student, (* $P < 0,05$).

El análisis de las relaciones de abundancia entre metales (Cu/Fe, Cu/Zn y Fe/Zn) permitió establecer que estas se ven modificadas al comparar el contenido intracelular en células tratadas y sus controles, como también al comparar entre tratamientos. El detalle de estas diferencias, para los tiempos de tratamiento indicados se muestra en la Tabla 4. La relación Cu/Fe se vio incrementada tanto con la exposición a Cu:His como con DFO respecto al control, lo que está dado por el efecto conjunto del aumento en el contenido intracelular de Cu y la disminución en el contenido de Fe. A pesar de mantener esta tendencia entre tratamientos, se puede observar que esta razón es mayor en las células tratadas con Cu:His que con DFO lo cual se explica, no por la disminución en el contenido de Fe, la cual es similar con ambos tratamientos, sino que por un aumento significativamente mayor en el contenido de Cu, argumento que se conserva con respecto a lo observado en células HepG2. Por su parte, la relación Cu/Zn también mostró un incremento con ambos tratamientos respecto a la condición control, siendo mayor la razón

en las muestras tratadas con Cu:His que con DFO, lo que también se explica por un mayor aumento en el contenido de Cu más que por cambios en el contenido de Zn. Por último, la razón Fe/Zn muestra leves diferencias tendientes a la baja comparando muestras tratadas y sus controles, lo cual se explica por la disminución en el contenido intracelular de Fe asociado a ambos tratamientos. Comparando entre tratamientos, esta razón se mantiene prácticamente constante, dado los similares contenidos de Fe y Zn en las muestras tratadas durante los tiempos señalados.

Estos resultados muestran que los tratamientos con Cu:His o DFO en células Caco-2 se correlacionan con modificaciones en el contenido intracelular de Cu y Fe, sin cambios en el contenido de Zn en relación a las células no tratadas. Esto permite determinar que a pesar de las diferencias iniciales en el contenido de metales (en la condición basal) entre células HepG2 y Caco-2, ambos tratamientos permiten establecer desequilibrios en el estatus de metales traza para estas líneas celulares.

Tabla 4. Relaciones de abundancia entre metales en células Caco-2. La tabla muestra la razón entre el contenido intracelular de Cu y Fe, Cu y Zn o Fe y Zn detectados en células Caco-2 suplementadas con 100 μ M de Cu:His durante 48 h o expuestas a 100 μ M de DFO durante 48 h y sus controles. Las razones señaladas se calcularon a partir de valores promedios de contenido intracelular de metales provenientes de tres réplicas biológicas

Tratamiento \ Razón	Cu/Fe	Cu/Zn	Fe/Zn
Control	0,32	0,11	0,33
Cu:His (48 h)	3,38	0,82	0,24
DFO (48 h)	1,05	0,25	0,26

3.2. Determinación de la acumulación de ROS y de la viabilidad celular.

La acumulación de ROS fue estimada, como en células HepG2, a través de la cuantificación de la fluorescencia emitida por el fluorocromo H2DCF-DA. Los datos indican que las células Caco-2 suplementadas con Cu:His o expuestas a DFO respectivamente, mostraron un aumento significativo en la fluorescencia emitida por H2DCF-DA en relación a las células que no recibieron tratamientos, lo que permite inferir un aumento en la acumulación de ROS (Figuras 8A y 8B). Además de mantener esta tendencia, la magnitud de la acumulación de ROS es similar entre tratamientos en Caco-2 y equivalente al aumento observado en células HepG2. Esto se correlacionó con el aumento en el contenido intracelular de Cu con ambos tratamientos, sin embargo la magnitud de este incremento hacía suponer una mayor producción de ROS en las células tratadas con Cu:His que con DFO, situación que no ocurrió. Como el objetivo de utilizar las células Caco-2 fue comparar el efecto de los tratamientos con lo observado en HepG2, se estimó conveniente determinar también el efecto del suplemento de Cu:His o DFO sobre la viabilidad celular en forma indirecta mediante ensayos de reducción de MTT. Los datos indican que a diferencia de lo observado en células HepG2, donde la viabilidad celular disminuyó con ambos tratamientos, en células Caco-2 esta disminución se observó sólo en células suplementadas con Cu:His (en un 15 %), sin detectarse cambios de viabilidad asociados al tratamiento con DFO (Figuras 8C y 8D). Similares resultados fueron obtenidos estimando la viabilidad celular a partir del recuento de células por ensayos de exclusión con azul tripán (datos no mostrados). Estos datos sugieren que el tratamiento con Cu:His permite incrementar el contenido intracelular de Cu respecto de su control, lo que se correlaciona con un aumento en la acumulación de ROS y este con una disminución en la viabilidad celular, tal como sucede en HepG2. Sin embargo, las células Caco-2 tratadas con DFO, muestran un leve aumento en el contenido de Cu el que aparentemente no produce efectos sobre la viabilidad celular a pesar de correlacionarse con un aumento en la acumulación de ROS, similar al detectado en células suplementadas con Cu:His. Este aspecto se abordará en la sección de discusión de resultados.

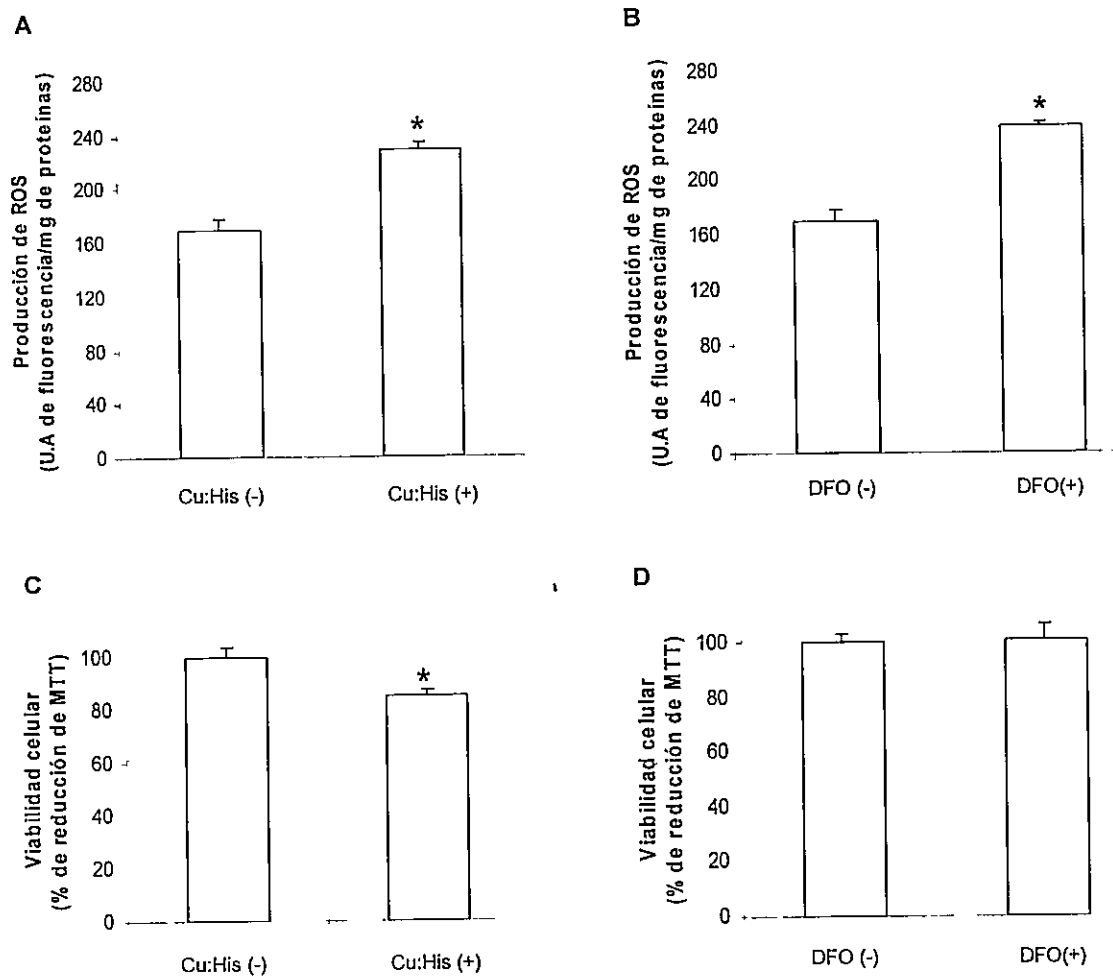


Figura 8. Determinación de la acumulación de ROS y de la viabilidad en células Caco-2 expuestas a Cu:His o DFO. La acumulación de ROS se estimó mediante ensayos de oxidación de H2DCF-DA (A y B) y la viabilidad celular mediante ensayos de reducción de MTT (C y D). Cada barra representa el promedio de tres réplicas biológicas con su respectivo error estándar. En todos los casos los análisis de significancia se realizaron mediante una prueba t de Student (* $P < 0,05$), comparando los datos provenientes de células suplementadas con 100 μM de Cu:His durante 48 h [Cu:His (+)] versus células no suplementadas [Cu:His (-)] o entre células expuestas a 100 μM de DFO durante 48 h [DFO (+)] y células no expuestas [DFO (-)].

3.3. Determinación de la abundancia relativa del transcrito *mt* y de la proteína metalotioneína (MT) en células Caco-2.

Como en células HepG2, la abundancia relativa del transcrito *mt* se cuantificó mediante PCR cuantitativo en tiempo real. Los datos de la figura 9 indican un aumento significativo en la abundancia del transcrito, cuando se comparan células Caco-2 suplementadas con Cu:His respecto a su control (Figura 9A), consistentemente con lo detectado en HepG2 pero en mayor magnitud. Por su parte, el tratamiento con DFO no produjo cambios significativos en la acumulación del transcrito en Caco-2 (Figura 9B), a diferencia de lo observado en células HepG2, lo que podría sugerir una regulación transcripcional tipo-celular específica bajo las condiciones señaladas.

Adicionalmente, se determinó la localización subcelular de la proteína MT en células Caco-2 tratadas y en sus controles mediante ensayos de IFI. Los datos indican que MT se distribuye tanto en el citosol como en la zona nuclear de células expuestas a Cu:His o DFO y en sus controles (Figuras 9C y 9D, respectivamente). Sin embargo, por las características del cultivo celular, no fue posible determinar si hay diferencias en el patrón de distribución de la proteína como se observó en HepG2. Por otra parte, mediante las imágenes obtenidas con estos ensayos, se evaluó si los tratamientos produjeron modificaciones en la abundancia de la proteína MT tal como se observó en células HepG2. Estos datos indican que la tendencia de acumulación del transcrito *mt* se corresponden con la abundancia de la proteína para la cual codifica, tanto en células Caco-2 suplementadas con Cu:His como en las expuestas a DFO, donde la abundancia de MT aumenta y no cambia en relación a sus controles respectivamente, (gráficos adjuntos a las figuras 9C y 9D). En detalle, el resultado del análisis indicó que en células Caco-2 expuestas a Cu:His, el nivel de la señal inmunoreactiva asociada a la expresión de MT aumentó en razón de 4,4 veces al compararla con la señal asociada a células no expuestas (de 18 a 49 unidades energéticas/píxel), mientras que la señal asociada al tratamiento con DFO no se vio modificada significativamente con respecto a su control. Finalmente, es importante destacar que tanto el transcrito como la

proteína MT son más abundantes en células HepG2 que Caco-2 (lo que se observa ya en la condición control), lo cual podría condicionar una capacidad diferencial de resistencia al daño producido por el exceso intracelular de Cu, entre tipos celulares.

En resumen, el conjunto de los datos presentados indican que en ambas líneas celulares la exposición a Cu:His o DFO fue capaz de modificar el contenido intracelular de Cu y Fe, no así el de Zn y también las relaciones de contenido que se establecen entre estos metales. Además, el aumento en el contenido intracelular de Cu se correlacionó generalmente con un aumento en la producción de ROS, una disminución en la viabilidad celular y un cambio de distribución subcelular de la proteína MT, así como también con un aumento en abundancia relativa del transcrito *mt* y la proteína MT.

Con el objetivo de determinar si los efectos señalados se correlacionan con cambios de abundancia relativa de transcritos, se completó y caracterizó una librería de cDNAs involucrados con el metabolismo de Cu, Fe, Zn y defensa contra daño oxidativo en humanos, desde la cual se obtuvieron los sustratos necesarios para realizar análisis de expresión génica en macroarrays.

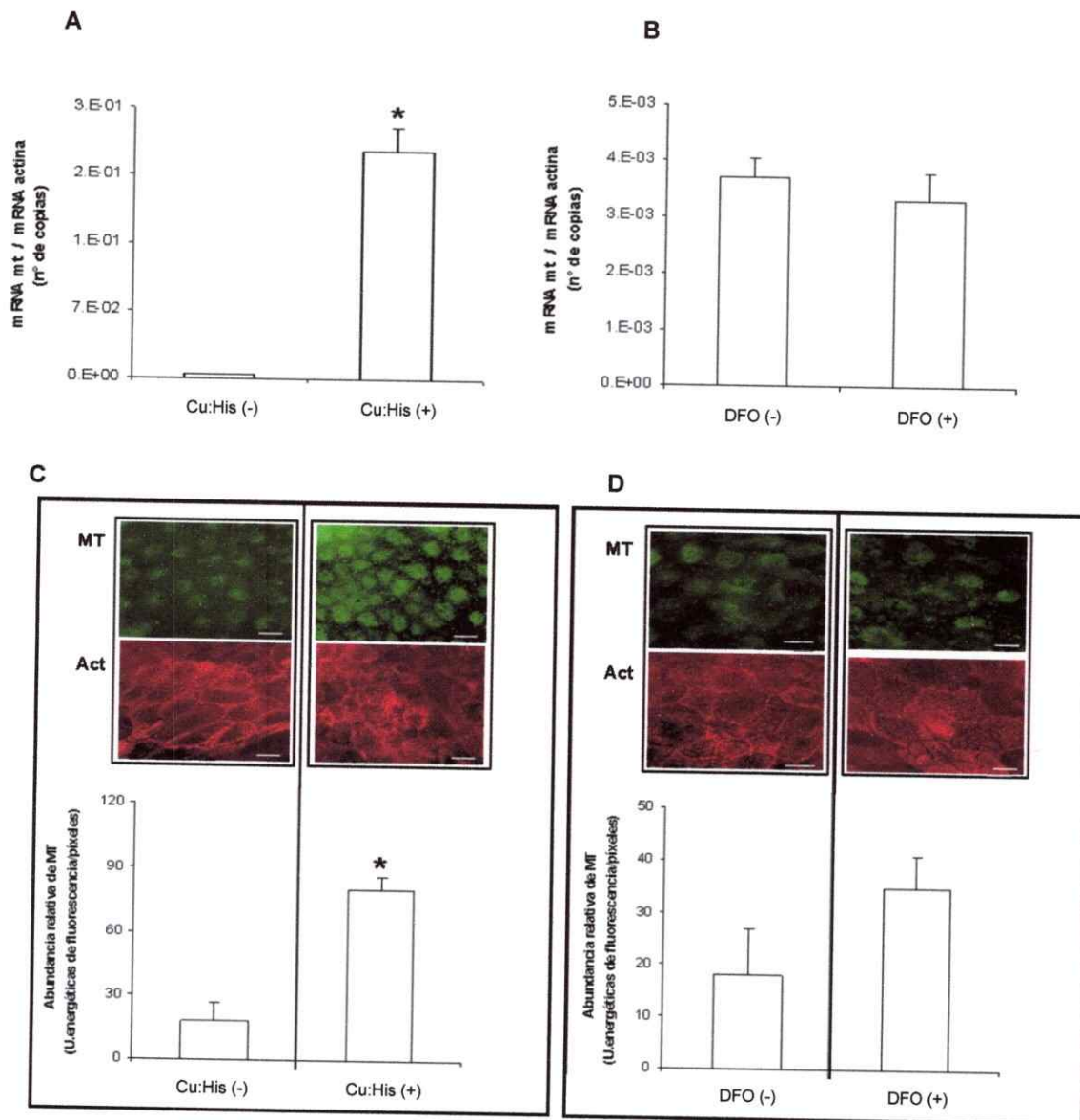


Figura 9. Determinación de la abundancia relativa del transcrito (*mt*) y de la proteína metalotioneína (MT) en células Caco-2 expuestas a Cu:His o DFO. Se cuantificó la abundancia del transcrito *mt* por PCR en tiempo real (panel superior) y la abundancia de la proteína (MT) mediante Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (panel inferior). En todos los casos se compararon los datos provenientes de células suplementadas con 100 μ M de Cu:His durante 48 h [Cu:His (+)] versus células no suplementadas [Cu:His (-)] (A y C) o entre células expuestas a 100 μ M de DFO durante 48 h [DFO (+)] y células no expuestas [DFO (-)] (B y D). Las barras correspondientes a la cuantificación del transcrito de *mt* representan el promedio de tres réplicas biológicas normalizadas por la abundancia del transcrito *act β* . Las barras correspondientes a la abundancia de MT representan el promedio de intensidad de la señal inmunoreactiva asociada a MT, determinada por análisis densitométrico a partir de nueve fotografías como las que se muestran adjuntas (MT en verde y Actina en rojo). En cada fotografía, la barra blanca representa una longitud de 10 μ m. Los análisis de significancia estadística se realizaron mediante una prueba t de Student, (* $P < 0,05$).

4. Construcción y caracterización de una librería de cDNAs vinculados al metabolismo de Cu, Fe, Zn y defensa contra daño oxidativo en humanos.

La construcción de una librería que contenga cDNAs relacionados con el metabolismo de Cu, Fe, Zn y vinculados a la defensa contra el daño oxidativo, se realizó con el objetivo de tener disponible de forma constante los sustratos necesarios para hacer análisis de expresión génica. En primer lugar se realizó una selección basada en antecedentes bibliográficos de aquellos genes que estuviesen asociados a los procesos biológicos mencionados, luego se procedió a adquirir los clones disponibles comercialmente y finalmente se clonaron aquellos que no lo estaban. Esta última etapa requirió un esfuerzo importante tanto en el diseño de partidores como en la puesta a punto de las condiciones de amplificación. Los resultados más significativos asociados a estas etapas del desarrollo de la tesis se describen en detalle a continuación.

4.1. Construcción de la librería.

El conjunto de genes vinculados al metabolismo de Cu, Fe, Zn y defensa contra el daño oxidativo (Tabla 5) que forman parte de la genoteca fueron seleccionados por revisión bibliográfica, a partir de las referencias publicadas en Pubmed y revisados en Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Ambas bases de datos se encuentran disponibles en NCBI. La selección de genes se realizó generando búsquedas por palabras claves (copper, iron, zinc, oxidative stress, gene expresión) de forma independiente y combinadas en la base de datos Pubmed. Los criterios de selección fueron arbitrarios y fundamentalmente basados en la frecuencia de publicaciones para cada gen (los seleccionados fueron los de mayor frecuencia), la importancia asignada a su producto génico en el metabolismo de metales traza y/o estrés oxidativo y la frecuencia de aparición en revisiones de alto índice de impacto ISI y revistas especializadas en metabolismo de metales.

De los treinta y ocho genes seleccionados, diecisiete fueron arbitrariamente agrupados como vinculados al metabolismo de Cu, diecisiete vinculados al metabolismo de

Fe y cuatro involucrados en metabolismo de Zn o defensa contra daño oxidativo. Adicionalmente, esta genoteca cuenta con tres cDNAs que son utilizados tradicionalmente como normalizadores de datos de expresión génica en humanos, por ser de expresión constitutiva (*gpdh*, *actβ* y *tuba2*), dos genes de organismos no humanos (*cg6132* y *rbcs*) y un gen bacteriano (*dap*) que fueron utilizados como controles negativos y heterólogo de la retrotranscripción, respectivamente.

Un subconjunto de veinte genes seleccionados corresponden a clones de cDNAs de largo completo (Full – Length cDNAs) que fueron obtenidos comercialmente desde la colección de genes de mamíferos (MGC) del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos. Otro subconjunto de nueve genes fue obtenido desde clones que se encontraban disponibles en nuestro laboratorio. Con el propósito de completar la genoteca, un subconjunto de quince clones fueron generados durante esta tesis. Estos corresponden a productos de PCR de tamaño variable, generados a partir cDNAs de transcritos involucrados en el metabolismo de Cu, Fe, Zn y defensa contra el daño oxidativo. Dentro de este subconjunto se encuentran también los genes vinculados a procesos biológicos no relacionados con los metabolismos mencionados, los cuales serían utilizados como normalizadores en los análisis de expresión génica. Los productos de PCR fueron purificados, ligados al vector pGEM–T Easy o pTrcHis2-TOPO y utilizados para la transformación de bacterias *E.coli* competentes. Los transformantes positivos fueron seleccionados manualmente y almacenados junto a los otros veintinueve clones. La información asociada a los genes que forman parte de esta librería se encuentran detallados en la Tabla 5.

Tabla 5. Características de los genes seleccionados para análisis de expresión génica. La tabla muestra de izquierda a derecha el símbolo (nombre) de los genes que forman parte de la genoteca, el número de acceso a la base de datos GenBank, la categoría a la cual fueron asignados y el nombre del producto génico (según OMIM). FTM: Factor de transcripción de regulación por metales; E. Ox: estrés oxidativo y GEC: Gen de expresión constitutiva.

Símbolo (nombre)	ID GenBank	Categoría	Producto Génico
<i>ctr1</i>	NM_001859	Metabolismo de Cu	High-affinity copper uptake protein 1
<i>ctr2</i>	NM_001860	Metabolismo de Cu	Low-affinity copper uptake protein 2
<i>atp7a, mnk</i>	NM_000052	Metabolismo de Cu	Copper-transporting ATPase 1
<i>atp7b, wd</i>	NM_000053	Metabolismo de Cu	Copper-transporting ATPase 2
<i>mt</i>	BC029475	Metabolismo de Cu	Metallothionein 1A
<i>pmp</i>	BC012844	Metabolismo de Cu	Prion
<i>app</i>	NM_000484	Metabolismo de Cu	Amyloid Precursor Protein
<i>aplp2</i>	BC000373	Metabolismo de Cu	Amyloid beta (A4) precursor-like protein 2
<i>cp</i>	NM_000096	Metabolismo de Cu	Ceruloplasmin
<i>sod1</i>	NM_000454	Metabolismo de Cu	Superoxide dismutase 1 copper chaperone
<i>murr1</i>	BC022046	Metabolismo de Cu	Copper metabolism domain containing 1
<i>cox11</i>	BC005895	Metabolismo de Cu	Cytochrome c oxidase copper chaperone 11
<i>cox17</i>	NM_005694	Metabolismo de Cu	Cytochrome c oxidase copper chaperone 17
<i>atox1</i>	NM_004045	Metabolismo de Cu	Copper chaperone for ATP7A y ATP7B
<i>ccs</i>	NM_005125	Metabolismo de Cu	Copper chaperone for superoxide dismutase
<i>sco1</i>	BC015504	Metabolismo de Cu	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 1
<i>sco2</i>	NM_005138	Metabolismo de Cu	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2
<i>tfr1</i>	BC001188	Metabolismo de Fe	Transferrin receptor (p90, CD71)
<i>tfr2</i>	NM_003227	Metabolismo de Fe	Transferrin receptor 2
<i>tf</i>	BC059367	Metabolismo de Fe	Transferrin
<i>dmt1</i>	BC002592	Metabolismo de Fe	Solute carrier family 40
<i>dcytb</i>	BC016900	Metabolismo de Fe	Cytochrome b reductase 1
<i>ireg1</i>	BC035893	Metabolismo de Fe	Ferroportin
<i>heph</i>	BC011561	Metabolismo de Fe	Hephaestin
<i>fth1</i>	BC001399	Metabolismo de Fe	Ferritin Heavy-polipeptide 1
<i>ftl</i>	BC004245	Metabolismo de Fe	Ferritin Light-polipeptide 1
<i>irp1-aco1</i>	BC018103	Metabolismo de Fe	Iron response protein 1
<i>irp2-ireb2</i>	NM_004136	Metabolismo de Fe	Iron response protein 2
<i>abcb7</i>	BC006323	Metabolismo de Fe	ATP-binding cassette, sub-family B, member 7
<i>fxn</i>	BC023633	Metabolismo de Fe	Frataxin
<i>hmox1</i>	BC001491	Metabolismo de Fe	Heme oxygenase (decycling) 1
<i>hfe (hla-h)</i>	HSU60319	Metabolismo de Fe	Hereditary hemochromatosis
<i>hepc-hamp</i>	NM_021175	Metabolismo de Fe	Hepcidin - antimicrobial peptide
<i>cubn</i>	NM_001081	Metabolismo de Fe	Cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)
<i>zirt1</i>	BC002563	Metabolismo de Zn	Zinc transporter, Solute carrier family 39 member 1
<i>mtf1</i>	NM_005955	Metabolismo de Zn (FTM)	Metal-regulatory transcription factor 1
<i>gcs</i>	NM_001498	Defensa contra E.Ox.	Glutamate-cysteine ligase, catalytic
<i>gsr</i>	BM976198	Defensa contra E.Ox.	Glutathione reductase
<i>gpdh</i>	NM_002046	Normalizador - GEC	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<i>actβ</i>	NM_001101	Normalizador - GEC	Actin, beta
<i>tuba2</i>	NM_011654	Normalizador - GEC	Tubulin, alpha 2
<i>dap</i>	L38424	Control heterólogo	Dihydrodipicolinate reductase
<i>rbcS</i>	BT000362	Control negativo	Ribulose biphosphate carboxylase
<i>cg6132</i>	AE003544	Control negativo	CG6132

4.2. Verificación de secuencias clonadas.

Los veinte clones adquiridos desde MGC fueron sembrados en placas con medio LB-Agar junto al antibiótico adecuado para la selección de colonias (ampicilina o cloranfenicol). Con el propósito de verificar si las colonias seleccionadas poseían el inserto esperado, se replicaron en medio LB líquido y se extrajo su DNA plasmidial a partir del cual se hicieron ensayos de digestión con distintas enzimas de restricción, lo que permitió generar patrones electroforéticos característicos para cada constructo vector-inserto (Figura 10). Estos patrones fueron comparados con mapas de digestión virtuales generados *in silico* para cada caso con el programa Primer Premier 5.0, lo que permitió determinar que el resultado de todas las digestiones produjeron las bandas de tamaños esperados.

Los quince clones generados durante esta tesis fueron sembrados en placas con medio LB-Agar, x-gal y ampicilina. Las colonias blancas que representan clones que poseen un inserto ligado al vector fueron replicadas en medio LB líquido, se les extrajo su DNA plasmidial y se hicieron ensayos de digestión con la enzima de restricción *EcoRI* en todos los casos, excepto para el clon *ctr1*, el que fue digerido con la enzima *EcoRV*. Con los productos de digestión se generaron los patrones electroforéticos que se muestran en la figura 11. En los carriles numerados de 1 a 14 se observa una banda superior (3015 pb) correspondiente al vector pGEM-T Easy sin inserto y la banda inferior corresponde al inserto. En todos los casos se recupera una banda única para el inserto con la excepción de *cp* y *ctr1* (Figura 11). Esto se explica porque la secuencia clonada de *cp* posee un sitio interno de digestión reconocido por *EcoRI* y porque *EcoRV* reconoce un sitio de digestión en la secuencia de *ctr1* y uno en la secuencia del vector. Todos los patrones de digestión mostraron tamaños de bandas esperados, lo que confirma que todas las colonias aisladas poseen el inserto correcto.

Para verificar la identidad de los insertos de los nueve clones que se encontraban disponibles en nuestro laboratorio, estos fueron amplificados mediante PCR utilizando los partidores del vector (T7 y SP6) o partidores específicos para cada inserto. En todos los casos se obtuvieron los productos de amplificación esperados (Figura 12). El resultado final

de estas verificaciones nos permite acreditar que la genoteca cuenta con cuarenta y cuatro clones que poseen los insertos esperados en sus respectivos vectores.

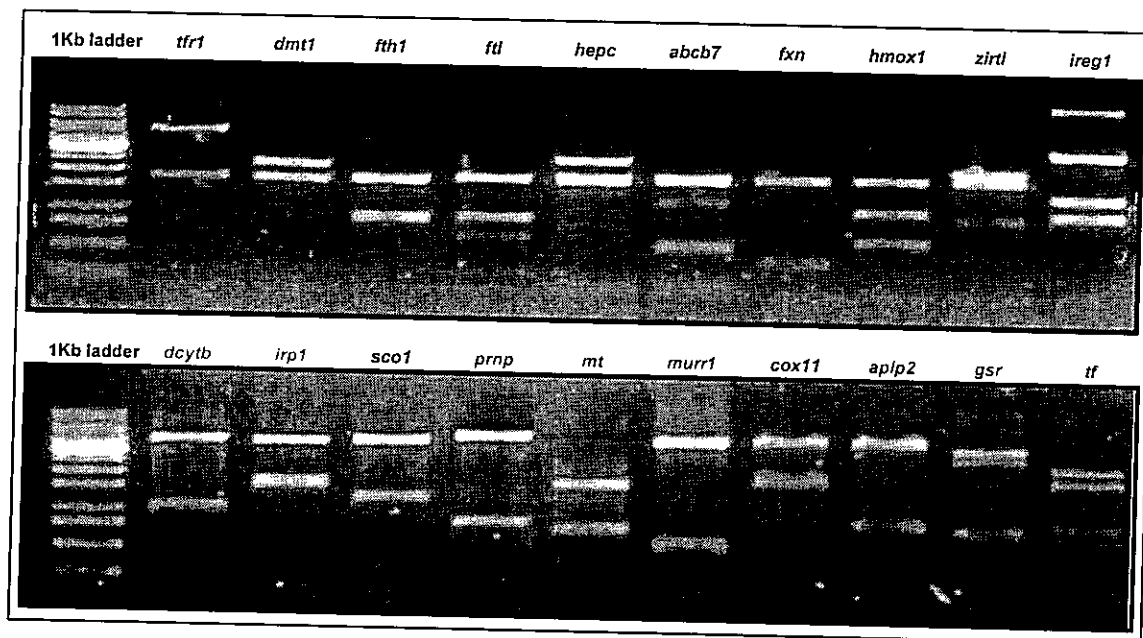


Figura 10. Verificación por análisis de restricción de la identidad de los clones adquiridos comercialmente. Electroforesis en un gel de agarosa al 1 % de los productos de digestión de los clones Full-Length cDNAs adquiridos de forma comercial, con distintas enzimas de restricción. Los resultados fueron comparados con los patrones de digestión predichos *in silico*, observándose los tamaños de bandas esperados para todos los casos.

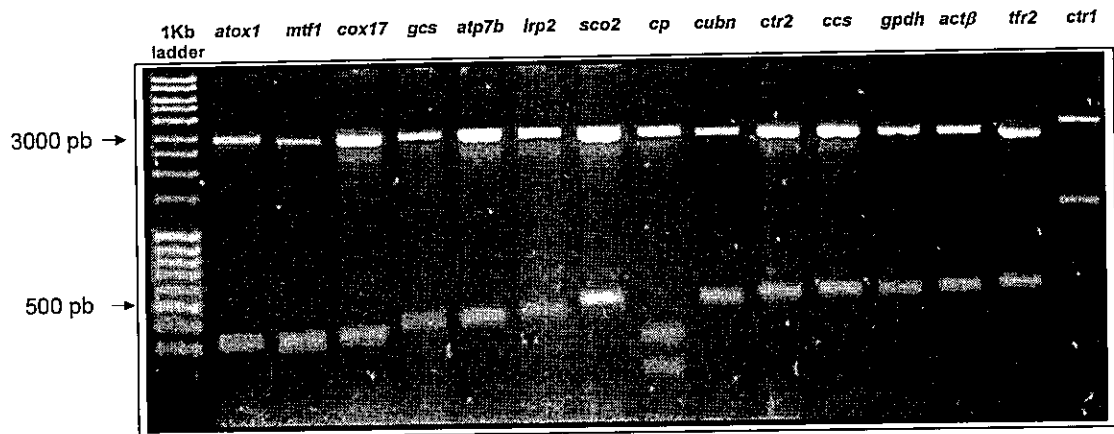


Figura 11. Verificación por análisis de restricción de la identidad de los productos clonados. Electroforesis en un gel de agarosa al 1 % de los productos de digestión con *EcoRI* para los productos de PCR (insertos) ligados en pGEM-T Easy (1-14). El carril 15 muestra el producto de la digestión del constructo *ctr1*- pTrcHis2-TOPO digerido con la endonucleasa *EcoRV*. Todas las bandas presentaron los tamaños esperados. En el marcador de peso molecular las bandas bajo 3000 pb corresponden a 2500, 2000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300 y 200 pb.

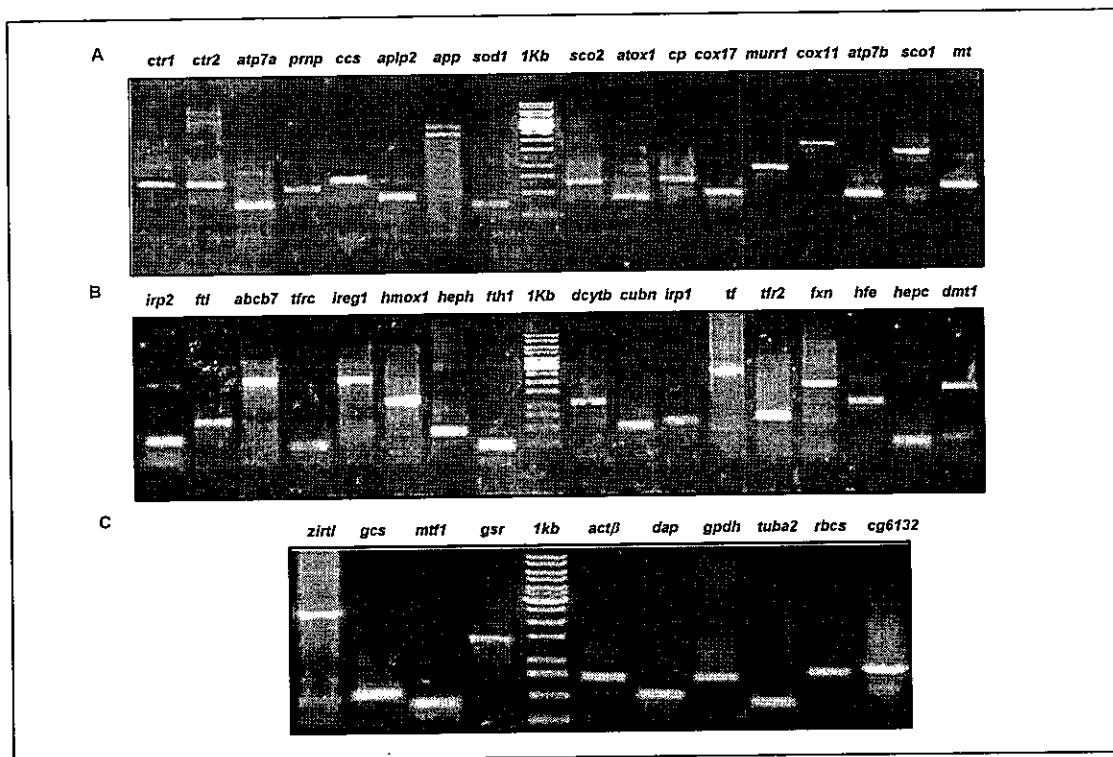


Figura 12. Amplificación por PCR de fragmentos a sembrar en membranas de nylon. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados a partir de los clones que forman parte de la librería de genes vinculados al metabolismo de Cu (panel A), Fe (panel B), Zn, defensa contra el daño oxidativo y genes utilizados como controles (panel C).

5. Expresión de genes involucrados en el metabolismo de Cu, Fe, Zn y defensa contra el daño oxidativo en células HepG2 expuestas a Cu:His o DFO.

Para estos análisis se generaron tres membranas de nylon sembradas con los productos de PCR sintetizados a partir de los clones listados en la Tabla 5 (macroarrays) y pertenecientes a la librería desarrollada. Estas fueron hibridadas con sondas radiactivas generadas a partir del RNA mensajero aislado de células HepG2 expuestas a Cu:His o DFO o no expuestas (controles). Posteriormente, se obtuvieron los datos correspondientes a las señales de hibridación para los diferentes puntos de siembra, se seleccionaron los datos confiables, se normalizaron y se procedió a su análisis. La estrategia experimental y los resultados más significativos asociados al desarrollo de cada una de estas etapas se describen a continuación.

5.1. Producción de las matrices de hibridación.

Para la producción de las matrices de hibridación, fragmentos de tamaño variable de los insertos de los cuarenta y cuatro clones que forman parte de la genoteca fueron amplificados por PCR, con los partidores señalados en la tabla 2 (página 56) y sembrados sobre membranas de nylon. Una alícuota de cada producto de PCR fue examinado por electroforesis (Figura 12). En la mayoría de los casos se visualizaron bandas únicas y en aquellos carriles donde hubo más de una, la banda más intensa fue purificada y digerida con enzimas de restricción para verificar su identidad. En todos los casos el resultado indicó que la banda más intensa correspondió al producto de PCR de interés. Todos los productos de amplificación fueron sembrados en duplicado y en dos concentraciones, 5 ng (membranas Tipo I) y 0,5 ng (membranas Tipo II) sobre las membranas de nylon utilizadas en los ensayos de hibridación.

5.2. Evaluación de la calidad de los RNAs y producción de sondas complejas de hibridación.

Con el propósito de generar las sondas para los eventos de hibridación, células HepG2 fueron expuestas a 100 μ M de Cu:His o DFO durante 24 y 48 h respectivamente. Células no expuestas al metal ni al quelante de Fe fueron utilizadas como control. En cada caso se extrajo el RNA total desde el cual se purificó el mRNA, el que fue utilizado como sustrato para sintetizar cDNA de doble hebra. A partir de éste se generaron las sondas complejas marcadas radiactivamente con [32 P] dCTP. La calidad del RNA fue el factor que más influyó en los ensayos de hibridación y por lo tanto se estableció un riguroso sistema de control para seleccionar muestras de calidad adecuada. En primer lugar cada uno de los RNAs extraídos fue analizado mediante ensayos de electroforesis en geles denaturantes de agarosa (Figura 13A), para observar las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 28S y 18S. Solamente se utilizaron muestras de RNA que presentaban una proporción de al menos 2:1 entre la intensidad de las bandas del RNA 28S y 18S, respectivamente. Luego, para determinar si estos RNAs tenían un grado de pureza óptimo para utilizarlos como sustrato en la purificación de su mRNA, se midieron las razones de absorbancia 260/280 nm y 260/240 nm, que dan cuenta de la abundancia de proteínas y fenoles contaminantes en cada muestra de RNA, respectivamente. En la tabla adjunta a la figura 13A se muestra que los índices espectrofotométricos señalados son adecuados en todos los casos, puesto que se esperan valores entre 1,7 y 1,9 para la relación 260/240, mientras que para la relación 260/280 nm, los rangos esperados fluctúan entre 1,8 y 2,1. Además, en la tabla se indica la masa total de RNA extraído. Los RNAs extraídos que mostraron índices de calidad y pureza óptimos fueron utilizados para purificar su mRNA. Los rendimientos asociados a la purificación se muestran en la tabla de la figura 14A. Dado que en células de mamíferos la masa del mRNA representa entre un 1 y 5 % de la masa del RNA total, los rendimientos obtenidos se consideraron adecuados. La capacidad de detectar transcritos específicos a partir del mRNA purificado se evaluó sintetizando un cDNA de hebra simple desde el cual se amplificaron mediante PCR fragmentos de *gpdh* y *fth1*. Estos transcritos fueron

seleccionados para evaluar además si la calidad del cDNA y la técnica utilizada serían adecuadas para detectar transcritos que difieren en dos ordenes de magnitud en su abundancia relativa, dato que fue previamente obtenido en nuestro laboratorio. Una fotografía del gel que contiene las bandas conseguidas de la amplificación de *gpdh* y *fth1* se muestra en la figura 14B, señalando que las muestras de mRNA mantienen representadas diferentes abundancias de transcritos, lo cual es de trascendente importancia para la interpretación confiable de los futuros datos de expresión génica. En conclusión, estos resultados indican que nuestro procedimiento permitió obtener y utilizar mRNAs de calidad adecuada para su utilización en ensayos de expresión génica.

Las hibridaciones en matrices pueden realizarse utilizando una sonda generada directamente desde los mRNAs, marcando radiactivamente el cDNA de hebra simple. Esto se realizó como primera aproximación en ensayos de hibridación, sin embargo, la intensidad de las señales asociadas a los puntos obtenidos en las membranas fue baja imposibilitando la recuperación de datos confiables. Considerando que previamente habíamos verificado que la masa de productos de PCR sembrados en las membranas era suficiente para detectar señales de hibridación (mediante el marcaje radiactivo de una sonda simple, datos no mostrados), la baja intensidad de la señal de hibridación posiblemente se debía a una baja concentración inicial del mRNA. Por lo tanto se optó por cambiar el protocolo de marcaje, por un procedimiento que permite amplificar la masa de la sonda a hibridar. Para esto, a partir del mRNA purificado se sintetizó un cDNA de doble hebra no radiactivo, el cual se utilizó como sustrato para la amplificación y síntesis de la sonda mediante PCR radiactivo como se describe en la sección 2.5.2. de MATERIALES Y MÉTODOS.

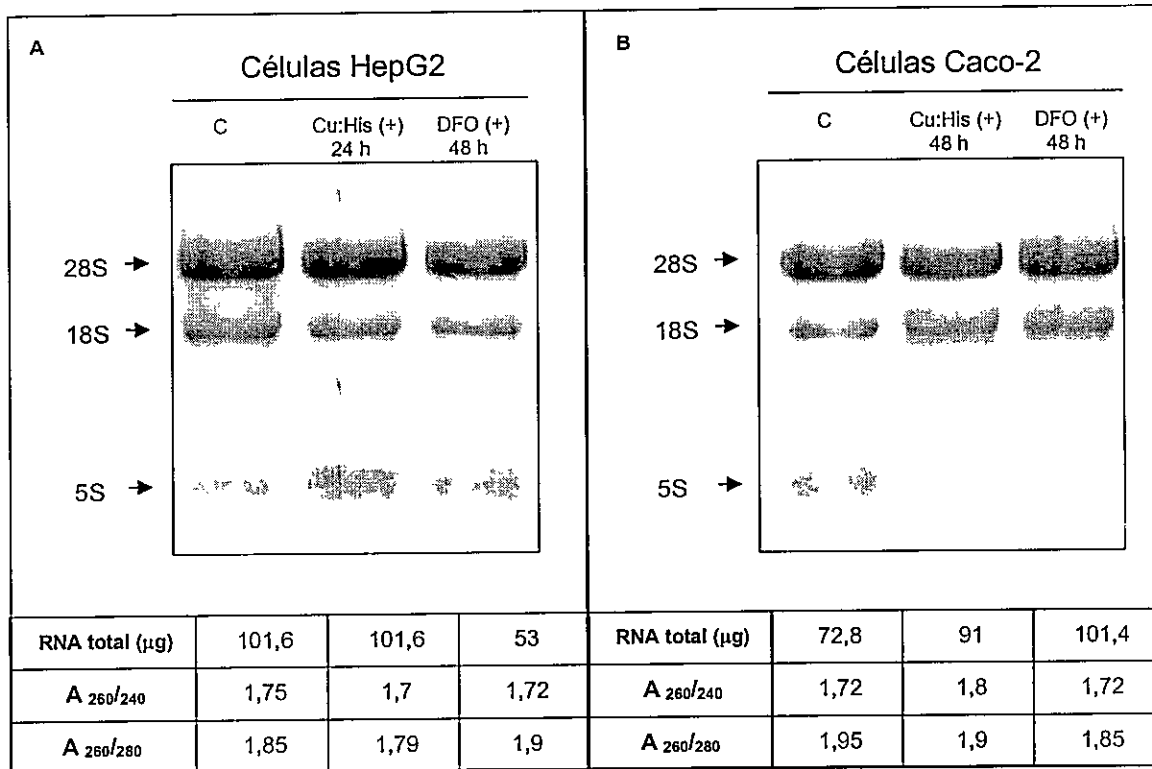


Figura 13. Índices de calidad de los RNAs extraídos desde células tratadas con Cu:His o DFO utilizados en los ensayos de hibridación. Electroforesis en geles denaturantes para RNA total de células no expuestas (C) o expuestas a 100 µM de Cu:His [Cu:His (+)] o DFO [DFO (+)] para HepG2 (A) y Caco-2 (B), por los periodos indicados. Las tres bandas que corresponden a los RNAs ribosomales se aprecian íntegras y en las proporciones adecuadas, mientras que los índices de calidad espectroscópicos muestran valores esperados para RNAs puros. Los valores indicados en la tabla corresponden a los datos obtenidos de una réplica biológica representativa de las tres utilizadas en los experimentos de expresión génica.

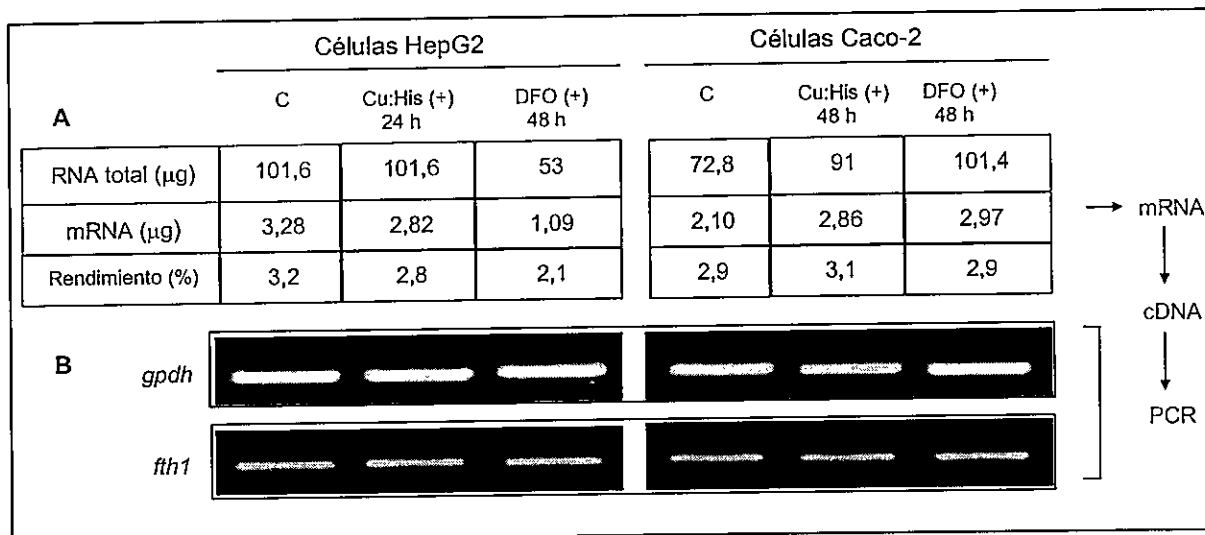


Figura 14. Índice de calidad y rendimiento de la purificación del mRNA. A) La tabla adjunta muestra la masa de RNA total extraída de cada muestra de células HepG2 y Caco-2 no tratadas (C) o tratadas con 100 µM de Cu:His [Cu:His (+)] o DFO [DFO (+)] por los periodos indicados, las cuales fueron utilizadas para purificar su mRNA mediante columnas de afinidad. Además se muestra la masa y el rendimiento obtenidos de tal purificación. B) Electroforesis en geles de agarosa al 1%, donde se observa el producto de amplificación por PCR de *gpdh* y *fth1*, a partir de los mRNAs purificados. Los valores presentados en la tabla corresponden a una muestra, representativa de las tres réplicas biológicas utilizadas en los experimentos de expresión génica.

5.3. Obtención de datos y análisis de calidad de la señal de hibridación.

Las señales de hibridación asociadas a cada punto de siembra presentes en las membranas fueron capturadas en una pantalla de BaFBr:Eu2 luego de 96 h de exposición. La información digitalizada de esta señal en las membranas fue representada en una imagen en formato TIFF obtenida utilizando el Phosphoimager personal FX (BioRad); un ejemplo que permiten ver como lucen las membranas hibridizadas se muestra en la figura 15. Los valores de intensidad de la señal cruda de hibridación para cada punto fueron obtenidos desde estas imágenes por cuantificación densitométrica de píxeles utilizando el programa VersArray Analyzer (BioRad), el cual utiliza una grilla de tamaño de celda variable para ajustar los puntos.

Con el objetivo de determinar qué puntos en las membranas correspondían a señales de hibridación y cuales registraban solamente ruido, se seleccionaron 24 puntos al azar en las membranas en zonas donde no hubo siembra de productos de amplificación (correspondiente a la zona señalada por el rectángulo de líneas segmentadas en la "membrana control" de la figura 15) a los que se les cuantificó el ruido local. Al valor de intensidad de la señal cruda de hibridación en los puntos de siembra se les restó este ruido local, obteniéndose señales netas de hibridación. Para seleccionar señales netas de hibridación no asociadas a artefactos de la técnica se utilizaron dos criterios principales, 1) un valor umbral por sobre el cual la señal es confiable y 2) la eliminación de señales contaminadas por señales vecinas. Para todas las membranas se utilizó como valor umbral el promedio de los ruidos asociados a señales en puntos de no siembra, más cinco veces su desviación estándar. Todas aquellas señales asociadas a puntos de siembra que sobrepasaron este valor umbral fueron consideradas confiables para los análisis de expresión génica. Posteriormente, por inspección visual fueron eliminados de los siguientes análisis todos aquellos puntos de hibridación que mostraban señales contaminadas por señales de puntos de hibridación vecinos. Después de aplicar ambos filtros, el porcentaje de recuperación de datos confiables en las membranas Tipo I, fue de 81, 54 y 70 % de los datos en muestras controles, tratadas con Cu:His o con DFO, respectivamente. Por su parte,

las membranas Tipo II mostraron porcentajes de recuperación del 47, 66 y 72 % de los datos en muestras controles, tratadas con Cu:His o con DFO, respectivamente, como se muestra en la figura 16. Hay que destacar que aunque el promedio de las señales de hibridación en membranas Tipo I fue mayor que en membranas Tipo II, no se recuperó un mayor porcentaje de datos en estas membranas debido a que en los tratamientos con Cu:His o DFO un alto número puntos fueron eliminadas por presentar señales contaminadas por vecinos.

Finalmente, otro aspecto relevante para evaluar la calidad de los ensayos de hibridación fue determinar su reproducibilidad. La figura 17 muestra las curvas de tendencia para las tres condiciones experimentales en membranas Tipo I y Tipo II, indicando el grado de agregación y correlación entre las señales netas de hibridación entre réplicas experimentales. El grado de agregación y correlación de las señales de hibridación se determinó mediante el valor de R^2 y la pendiente de la recta, respectivamente. El análisis de estos indicadores permitió determinar que la reproducibilidad entre los duplicados es similar en las membranas Tipo I y en las Tipo II, encontrándose que el índice de correlación fluctúa entre 0,91 y 0,99, mientras que todas las pendientes son similares a 1, fluctuando entre 0,94 y 1,20. En su conjunto, los ensayos realizados y sus resultados permitieron certificar señales confiables de hibridación y con réplicas de buena calidad para los análisis de expresión génica.

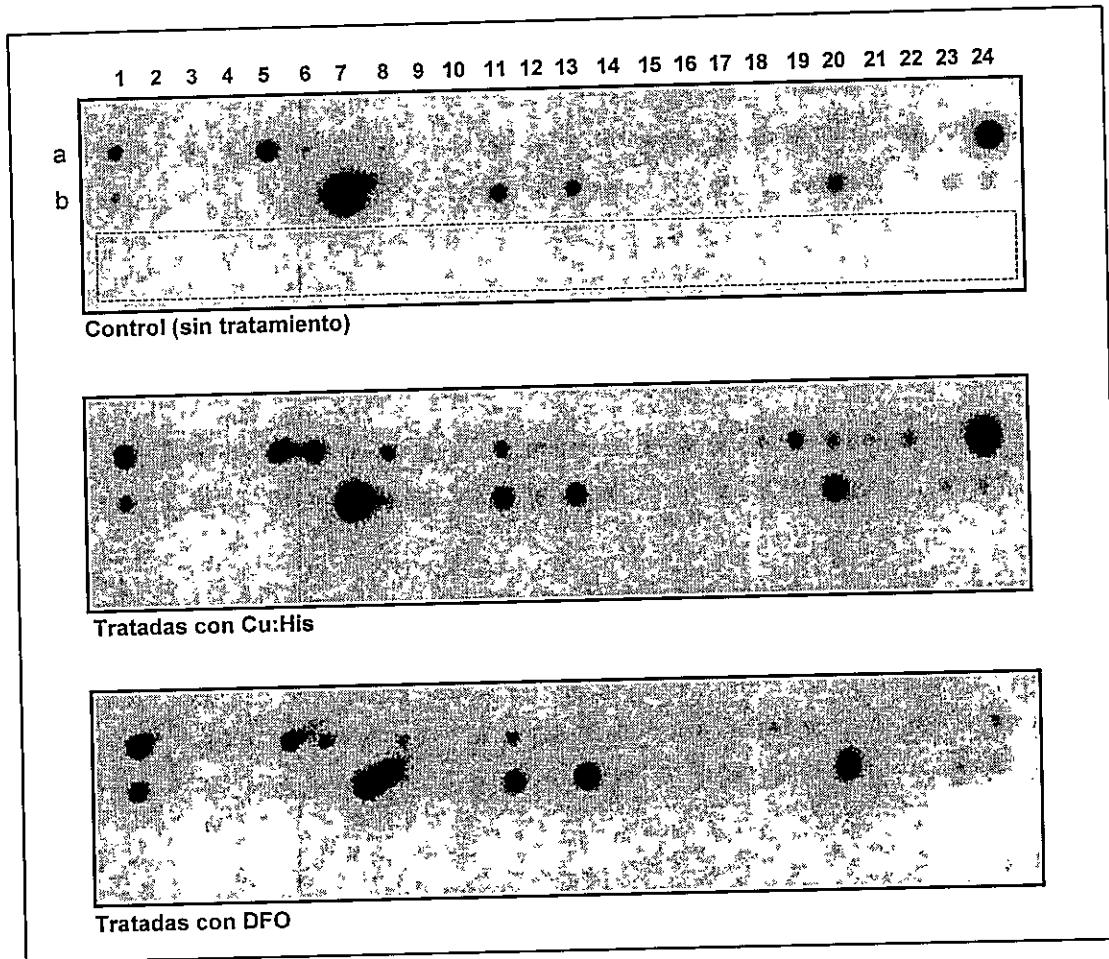


Figura 15. Hibridación en matrices con sondas provenientes de células HepG2 no expuestas o expuestas a Cu:His o DFO. Las imágenes que se presentan fueron obtenidas mediante el Phosphoimager Personal FX (BioRad) y corresponden a membranas Tipo II, hibridadas con sondas radioactivas, sintetizadas a partir del mRNA extraído de células HepG2 no expuestas (control) o expuestas a 100 μ M de Cu:His (por 24 h) o DFO (por 48 h) como se indica en la figura. El rectángulo señalado con líneas segmentadas en la membrana "control" representa la zona en donde se midió la intensidad de señales que fueron consideradas ruido (hibridación inespecífica). Los productos de amplificación fueron sembrados en dos filas y veinticuatro columnas en el orden que se indica. En a1:dap (2 ng), a2:H₂O, a3:sco1, a4:cox11, a5:mt, a6:prnp, a7:cp, a8:aplp2, a9:atp7a, a10:ctr1, a11:dap (1 ng), a12: dap (0,2 ng), a13:ctr2, a14:gcs, a15:gsr, a16:abcb7, a17:dcytb, a18:fxn, a19:hmx1, a20: hepc, a21:irp1, a22:fth1, a23: H₂O, a24:ftl, b1:atox1, b2:rbc, b3:sco2, b4:cox17, b5:ccs, b6:sod1, b7:app, b8:atp7b, b9:murr1, b10:mtf1, b11:act β , b12:tuba2, b13:gpdh, b14:zirtl, b15:tfr, b16:tfr2, b17:ireg1, b18:heph, b19:hfe, b20:tf, b21:irp2, b22:dmt1, b23:cg6132, b24:cubn.

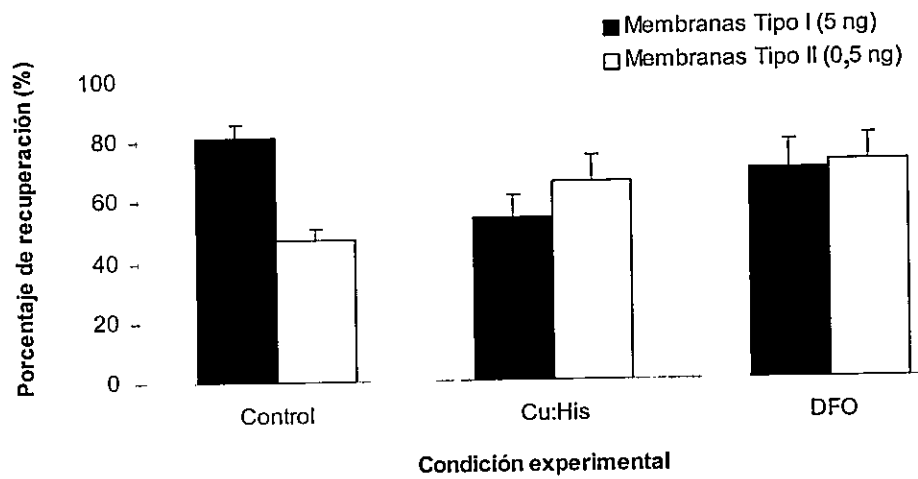


Figura 16. Recuperación de las señales de hibridación. El gráfico muestra los porcentajes promedios de recuperación de señales confiables en cada experimento, para membranas Tipo I (barras negras) y membranas Tipo II (barras blancas).

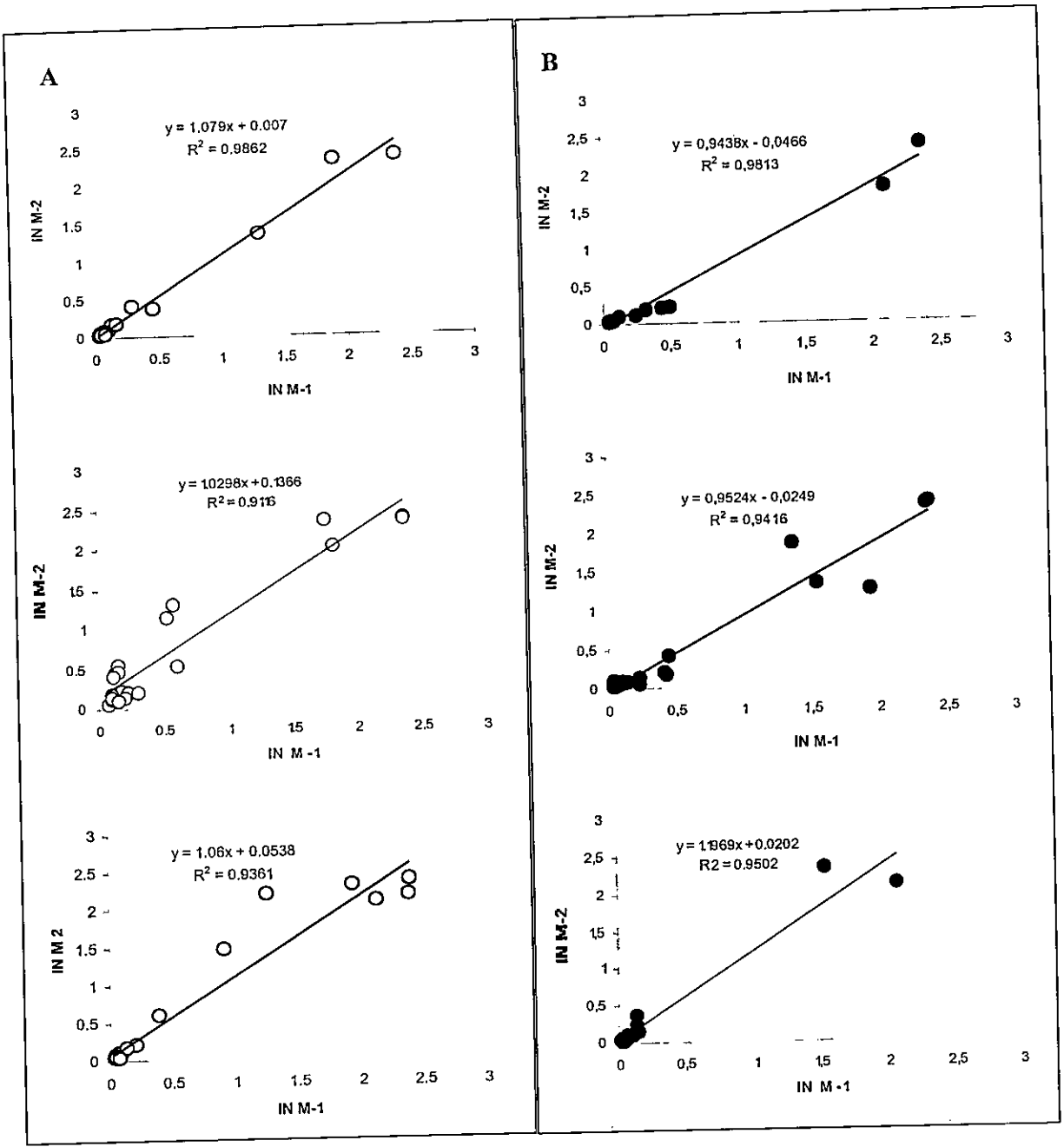


Figura 17. Reproducibilidad entre membranas. Los gráficos representan las intensidades netas versus intensidades netas entre réplicas experimentales de las membranas Tipo II (A) y Tipo I (B). Las membranas fueron hibridadas con sondas provenientes de células HepG2 no tratadas (gráficos superiores), tratadas con 100 μM de Cu:His (gráficos centrales) o con DFO (gráficos inferiores). Los datos representan las intensidades de señal neta de hibridación para una réplica biológica representativa de las otras dos. En cada caso se indica la ecuación de la recta que da cuenta de la tendencia y el índice de correlación R^2 .

5.4. Procedimiento de normalización de datos de expresión génica en ensayos de hibridación.

Las membranas utilizadas en los ensayos de hibridación contaban con productos de amplificación utilizados como controles positivos, controles negativos, control heterólogo de la retrotranscripción, preguntas y de expresión constitutiva (según un amplio número de reportes publicados). De este último grupo se sembraron tres genes, *gpdh*, *act β* y *tuba2*, de los cuales sólo *gpdh* y *act β* fueron recuperados en todas las membranas. Como la recuperación de la señal asociado a estos transcritos resulta imprescindible para la normalización de los datos, la opción de utilizar *tuba2* fue descartada. En consecuencia *gpdh* y *act β* fueron seleccionados como posibles normalizadores, por lo cual se les efectuó una prueba de validación de esta condición. Para esto, se realizó la transcripción *in vitro* del gen heterólogo (*dap*) a partir del plásmido que contenía su gen, con el objetivo de obtener un mRNA de concentración conocida y marcarlo radiactivamente junto a la sonda compleja utilizada en las hibridaciones y así tener un control heterólogo de la retrotranscripción. Los resultados de este procedimiento se muestran en la figura 18A.

Con el objetivo antes planteado, a partir de los resultados de todas las hibridaciones, se calculó la razón entre el valor de intensidad de la señal neta de hibridación de cada uno de los transcritos seleccionados y el valor de intensidad de la señal neta de hibridación del heterólogo (el cual mostró baja variabilidad entre membranas). Los datos relativos a este procedimiento fueron graficados y se muestran en la figura 18B, donde se puede observar que la señal asociada a la abundancia de *act β* se muestra invariable entre el control y los tratamientos con Cu:His o DFO. Por su parte, la abundancia de *gpdh* se muestra invariable sólo entre el control y el tratamiento con Cu:His, mientras que en células tratadas con DFO aumenta su abundancia respecto a las no tratadas, lo cual lo inhabilita como gen normalizador para este tratamiento. Por esta razón, el transcrito seleccionado para normalizar los datos de expresión fue *act β* , el cual se utilizó para normalizar los datos de hibridación de ambos tratamientos, mientras *gpdh* se utilizó sólo para revalidar datos

provenientes de los tratamientos con Cu:His. El proceso de normalización utilizado permitió la comparación entre membranas sembradas con la misma masa de productos de PCR.

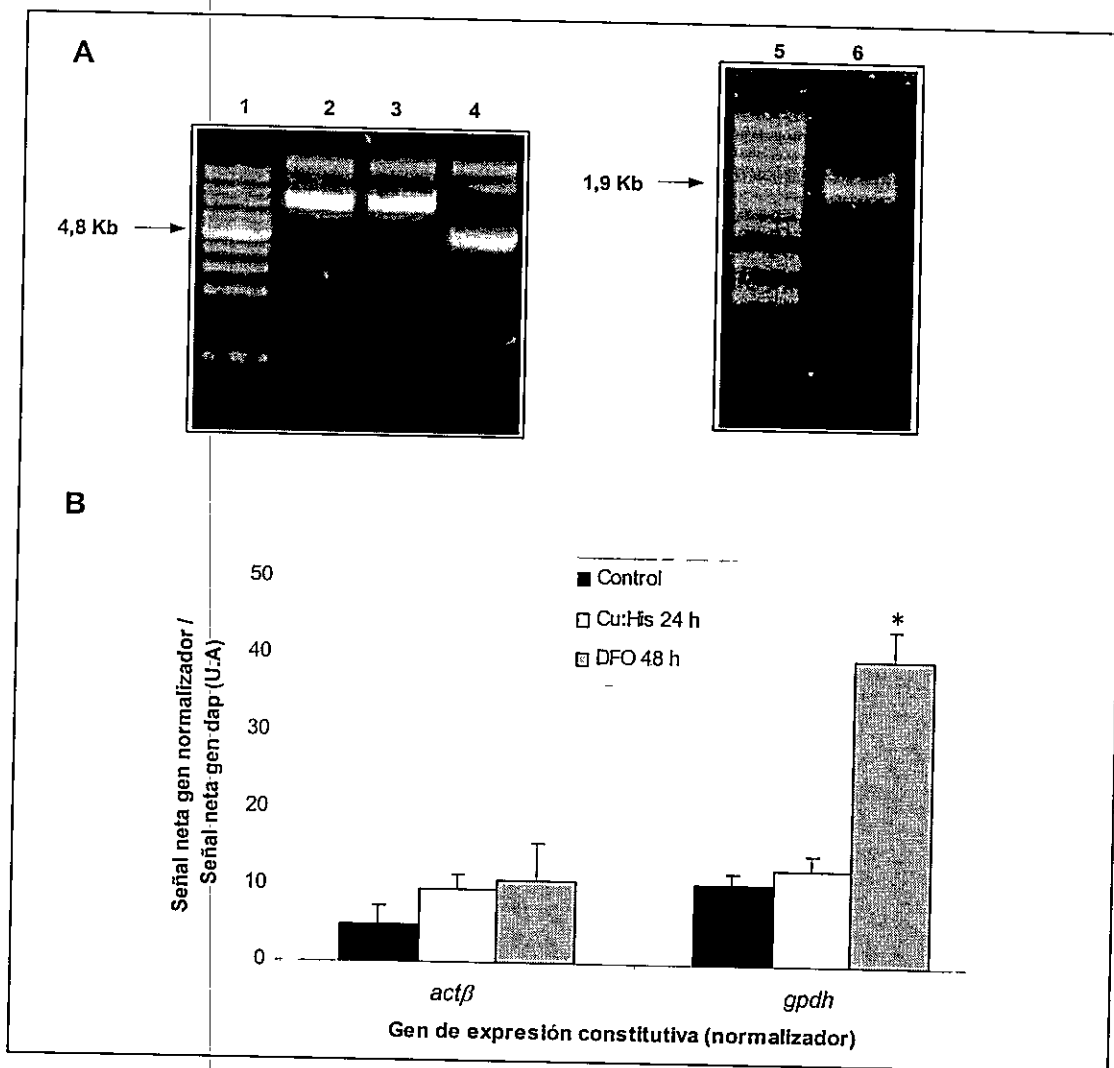


Figura 18. Transcripción *in vitro* de *dap* y análisis de la abundancia relativa de transcritos que codifican para *actβ* o *gpdh* (posibles normalizadores). En A) El panel de la izquierda muestra el producto de digestión del constructo (pBluescript II KS+ - *dap*) con la enzima de restricción *NotI*. Línea 1. RNA ladder, 2 y 3. constructo no linearizado y 4. constructo linearizado (4,8 Kb). El panel de la derecha muestra el producto de la transcripción *in vitro* de *dap* a partir del constructo linearizado. En 5. RNA ladder, 6. Producto de transcripción de *dap* (1,9 Kb). En B) señal neta de *actβ* o *gpdh* en relación a la señal neta de *dap*. Las barras corresponden al promedio de la razón para las señales netas provenientes de hibridaciones con sondas de células control (barras en negro), suplementadas con Cu:His (barras blancas) o células suplementadas con DFO (barras en gris), de todas las membranas utilizadas (doce puntos). Las barras corresponden al error estándar asociado a cada promedio y los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba t de Student (* $P < 0,05$) comparando datos provenientes de células tratadas y sus controles (sin tratamientos).

6. Análisis de expresión génica.

6.1. Genes diferencialmente expresados en células HepG2 tratadas con Cu:His.

El resultado del análisis de los datos obtenidos desde membranas hibridadas con sondas provenientes del tratamiento con Cu:His, considerando los datos obtenidos con membranas Tipo I y Tipo II en su conjunto, se encuentran resumidos en la Tabla 6.

Los datos indican que sólo quince genes mostraron diferencias significativas en la abundancia relativa de sus transcritos entre células HepG2 expuestas a 100 μM de Cu:His durante 24 h y las células no expuestas al metal. De este grupo, nueve de ellos (60%) están vinculados al metabolismo de Cu, entre los que se encuentran algunos que codifican para proteínas de almacenaje, chaperonas, transportadoras plasmáticas y usuarias de Cu. Los seis genes restantes (40%) han sido tradicionalmente vinculados al metabolismo de Fe y entre estos algunos codifican para proteínas del catabolismo de grupos Heme, transporte intracelular, transporte plasmático y almacenaje de Fe, además de un péptido regulador de sus niveles plasmáticos. La abundancia de transcritos normalizada utilizando también *gpdh* como referencia interna confirmó los cambios significativos de abundancia para los 15 genes de la tabla 6, indicando que estos cambios fueron independientes del transcrito utilizado como control interno.

Desde el punto de vista biológico, hubo consistencia con lo esperado. Células expuestas a altos niveles de Cu han mostrado un incremento en la abundancia del transcrito y de la proteína MT, contribuyendo a una mayor resistencia celular a los posibles daños producidos por el metal (Thiele, 1992; Tapia y col., 2004; Coyle y col., 2002). También se ha descrito un aumento en la abundancia del transcrito de *ccs*, *sod1* y *app* en fibroblastos de ratón (Tapia y col., 2004) y un aumento *cp* en la línea celular HepG2 (Daffada y Young, 1999) para similares tratamientos con Cu. Hasta donde sabemos, el aumento de la abundancia relativa de los transcritos que codifican para las chaperonas, *atox1* y *sco1* en células expuestas a Cu:His no ha sido reportado.

Como el tratamiento con Cu:His se correlacionó con una disminución en el contenido de Fe a las 24 h de exposición en relación a las células no tratadas, se esperó encontrar abundancias relativas diferenciales en transcritos vinculados al metabolismo de Fe, lo cual fue ratificado por los resultados obtenidos. Recientemente se reportó una fuerte inducción de *hmx1* en células HepG2 expuestas a Cu (Song y Freedman, 2005). Sin embargo, el aumento en la abundancia del transcrito de *abcb7*, *hepc* y *tf*, como la disminución en el nivel de transcrito de *ftl* y *fxn* no fueron necesariamente esperados desde el punto de vista de la exposición a Cu. Como el contenido intracelular de Fe en las células expuestas a Cu:His fue similar al reportado en células expuestas a DFO es posible inferir que los cambios de abundancia de estos genes se podrían explicar por la disminución en el contenido de Fe provocado por Cu. Sin embargo, como se midió la abundancia de los transcritos en las células expuestas a DFO, fue posible definir qué transcritos modificaron su abundancia en función de la disminución en el contenido de Fe y cuales se vieron influenciados directamente por el aumento en el contenido de Cu, o por los cambios en las relaciones que se establecieron entre estos metales debido al suplemento con Cu:His, posibilidades que serán discutidas en la sección correspondiente.

Tabla 6. Transcritos cuya abundancia cambia significativamente entre células HepG2 no tratadas y tratadas con Cu:His. La tabla muestra las veces cambio de transcritos normalizados por act β , representadas en todos los casos como el logaritmo en base dos de la razón entre las intensidades netas de membranas hibridadas con sondas provenientes de células HepG2 no tratadas y tratadas con 100 μ M de Cu:His por 24 h. En **negrita**, los genes vinculados al metabolismo de Fe y subrayados, genes vinculados al metabolismo de Cu, todos ellos ordenados de mayor a menor en función de las veces de cambio.

ID GenBank	Gen	Log ₂ (Cu:His/Control)
BC029475	<u>mt</u>	3,9
BC015504	<u>sco1</u>	2,4
BC012844	<u>pmp</u>	2,2
NM_000484	<u>app</u>	2,2
NM_000096	<u>cd</u>	2,1
BC006323	abcb7	1,8
BC001491	hmox1	1,8
BC000373	<u>aplp2</u>	1,5
NM_000454	<u>sod1</u>	1,3
NM_005125	<u>ccs</u>	1,3
NM_004045	<u>stox1</u>	1,2
BC059367	tf	1,1
NM_021175	hepc	0,9
BC004245	ftl	-1,0
BC023633	fxn	-1,6

6.2. Genes diferencialmente expresados en células HepG2 tratadas con DFO.

El resultado del análisis de los datos obtenidos desde membranas hibridadas con sondas provenientes del tratamiento con DFO, considerando los datos obtenidos con membranas Tipo I y Tipo II en su conjunto, se encuentran resumidos en la Tabla 7. Cabe recordar que el gen de expresión constitutiva seleccionado para normalizar los datos de hibridación provenientes de los tratamientos con DFO fue *actβ*, puesto que *gpdh* aumentó su abundancia en células tratadas con DFO (Figura 18 B)

Al igual que en los tratamientos con Cu:His, el tratamiento con DFO no sólo indujo cambios de expresión transcripcional en genes relacionados con el metabolismo de Fe, sino que también en genes vinculados tradicionalmente al metabolismo de Cu. En particular, este fenómeno se manifiesta al observar que los valores más altos de cambios de abundancia relativa corresponden a tres genes asociados al metabolismo de Cu (*mt*, *sco1* y *atox1*), detectándose también otros que codifican para proteínas usuarias de este metal. Estos transcritos podrían responder directamente a las variaciones del contenido de Fe, al aumento de ROS o al leve aumento en el contenido intracelular de Cu frente a la exposición a DFO (ver discusión). El aumento en la abundancia de *cp* asociado al tratamiento con DFO era esperado considerando algunos recientes antecedentes en células HepG2 (comunicación personal, H. J. McArdle, The Rowett Research Institute, UK), como también la inducción de *mt* en condiciones de deficiencia de Fe (Collins y col., 2005). Cabe destacar que todos los genes vinculados al metabolismo de Cu que mostraron cambios de abundancia en sus transcritos al exponer las células a DFO, también mostraron cambios con el tratamiento con Cu:His pero no necesariamente con la misma tendencia (ver discusión).

Los genes asociados al metabolismo de Fe para el tratamiento con DFO, mostraron en su mayoría una baja en los niveles de abundancia relativa a sus controles, exceptuando sólo a *tf*. Entre estos se encuentran algunos que codifican para proteínas involucradas en el catabolismo del grupo Heme, regulación sistémica y almacenamiento de Fe, además de genes que codifican para una ferroxidasa y un posible transportador mitocondrial del Fe. Entre los resultados esperados se encontró la disminución en los niveles del transcrito de la

cadena liviana de la ferritina (*ftl*) (Konijn y col., 1999) y hemocromatosis (*hfe*) (Han y col., 1999), y un aumento en la abundancia del transcrito que codifica para transferrina (*tf*) (Barnum-Huckins, 2000) y *gpdh* (Nakai y col., 1991).

Finalmente, la figura 19 muestra gráficamente el número de genes que presentaron modificaciones en la abundancia de sus transcritos diferenciando entre tratamientos. Se puede observar que la mayoría de los transcritos se correlacionan con los efectos de los tratamientos en conjunto, sin embargo no necesariamente lo hacen con la misma tendencia o magnitud. Además se detectaron ocho genes que cambian exclusivamente con un tratamiento en particular, cinco asociados sólo al tratamiento con DFO y tres asociados sólo al tratamiento con Cu:His, los cuales podrían ser potenciales marcadores para ensayos de expresión génica como respuesta a la exposición a condiciones de exceso de Cu o déficit de Fe en forma particular (ver discusión).

Tabla 7. Transcritos cuya abundancia cambia significativamente entre células HepG2 no tratadas y tratadas con DFO. La tabla muestra las veces cambio de transcritos normalizados por *actβ*, representadas en todos los casos como el logaritmo en base dos de la razón entre las intensidades netas de membranas híbridadas con sondas provenientes de células HepG2 no tratadas y tratadas con 100 μM de DFO. En **negrita**, los genes vinculados al metabolismo de Cu y subrayados, genes vinculados al metabolismo de Fe, todos ellos ordenados de mayor a menor en función de las veces de cambio.

ID GenBank	Gen	Log ₂ (DFO/Control)
BC029475	mt	4,1
BC015504	sco1	2,4
NM_000096	cp	2,2
NM_004045	atox1	1,6
BC059367	<u>tf</u>	1,4
NM_002046	<u>gpdh</u>	1,3
NM_000484	app	1,1
NM_003227	<u>tfr2</u>	-1,1
BC012844	prnp	-1,4
BC011561	<u>heph</u>	-1,6
NM_001081	<u>cubn</u>	-1,7
HSU60319	<u>hfe</u>	-2,0
NM_000454	sod1	-2,1
BC023633	<u>fxn</u>	-2,1
NM_021175	<u>hepc</u>	-2,8
BC001491	<u>hmox1</u>	-2,9
BC004245	<u>ftl</u>	-4,7

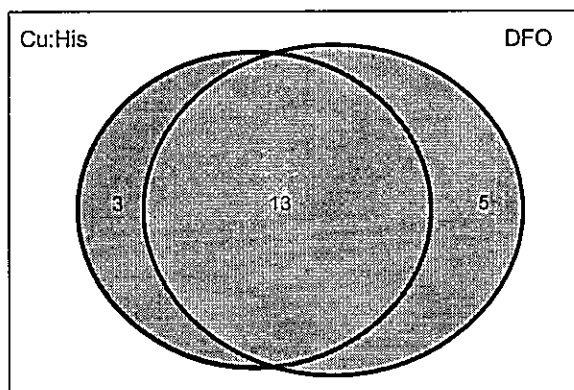


Figura 19. Número de genes diferencialmente expresados en células HepG2 tratadas con Cu:His o DFO. El gráfico de Venn indica el número de genes que cambiaron significativamente su abundancia durante los tratamientos. Tres de estos fueron exclusivos para el tratamiento Cu:His, cinco exclusivos para el tratamiento con DFO y trece lo hicieron en ambos casos.

7. Validación de datos de expresión génica y diferencias tipo celular – específicas.

Para validar los datos de expresión génica obtenidos en los ensayos de hibridación en membranas, se cuantificó la abundancia de algunos transcritos que mostraron cambios significativos en sus niveles entre los tratamientos y sus controles. Mediante ensayos de PCR en tiempo real se obtuvieron los resultados que se resumen en la tabla 8. Estos datos indican que todas las tendencias de cambios de expresión génica obtenidas en los ensayos de hibridación sobre membranas fueron validadas por esta técnica, encontrándose diferencias sólo en su magnitud, lo que se explica por las diferencias en la sensibilidad de las técnicas en cuestión. Entre los genes seleccionados para validar los cambios de abundancia relativa están los que codifican para proteínas de, 1) almacenaje de Cu (*mt*), 2) usuaria de Cu (*aplp2*) y 3) chaperona de Cu (*ccs*). Por otra parte, para certificar que algunos genes efectivamente no modificaron la abundancia de sus transcritos se midió el contenido de *fth1* e *ireg1*.

Con el propósito de contrastar los datos de abundancias de transcritos medidos en HepG2 y así monitorear variaciones tipo celular - específicos se midió la abundancia de los mismos transcritos señalados anteriormente en células Caco-2 expuestas a suplementos de 100 μ M de Cu:His o 100 μ M de DFO durante 48 h. La certificación de la calidad de los sustratos utilizados para los ensayos de PCR en tiempo real en Caco-2 se muestra en las figuras 13B y 14.

Los resultados indican que en HepG2, el transcrito *mt* mostró mayor abundancia en ambos tratamientos que en células no tratadas, mientras que en Caco-2 sólo aumentó con el suplemento de Cu:His. Los transcritos de *ccs* y *aplp2* no presentan cambios de abundancia en los tratamientos con DFO en ninguna línea celular. Sin embargo, ambos transcritos mostraron mayor abundancia en células HepG2 tratadas con Cu:His que en sus controles. Esta tendencia se conserva en Caco-2 para *ccs* pero no para *aplp2*. Por su parte, el transcrito de *fth1* no mostró cambios al analizarlo mediante ensayos de hibridaciones sobre membranas, lo cual se confirmó mediante PCR en tiempo real. Esto permitió evitar

la suposición que los genes que no mostraron cambios en los ensayos de hibridación sobre membranas correspondían a falsos negativos.

Finalmente, a pesar de no rescatarse en la mayoría de las membranas, el transcrito *ireg1* fue cuantificado por su potencial capacidad de ser un elemento común entre los metabolismos de Cu y Fe. Interesantemente, *ireg1* mostró mayor abundancia en los tratamientos con Cu:His que en los controles en la línea celular HepG2 pero no en Caco-2, sugiriendo una posible regulación tipo- celular específica.

Tabla 8. Validación de cambios de expresión de algunos genes ensayados por macroarrays. Cuantificación mediante PCR en tiempo real de la abundancia relativa de transcritos que cambiaron significativamente. Cada gen fue amplificado utilizando como sustratos los cDNAs que corresponden a cada sonda utilizada en los experimentos de hibridación en membranas. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en el Light Cycler Instrument (Roche). En todos los casos los genes fueron normalizados con *actβ* y las veces de cambio fueron representadas como el logaritmo en base dos de la razón entre el número de moléculas del transcrito en cuestión, provenientes de células HepG2 o Caco-2 tratadas con 100 μM de Cu:His o DFO y el número de moléculas del transcrito provenientes de células HepG2 o Caco-2 no tratadas. En **negrita**, datos que muestran tendencias diferenciales de variación en células Caco-2 respecto de HepG2, para un mismo tratamiento. SC: Sin cambio de expresión entre tratamientos y controles.

Gen	HepG2	Caco-2
	Log ₂	Log ₂
	Cu:His/Control	Cu:His/Control
<i>mt</i>	1,1	6,0
<i>ccs</i>	1,4	2,1
<i>aplp2</i>	1,8	SC
<i>ftth1</i>	SC	SC
<i>ireg1</i>	1,3	SC

Gen	HepG2	Caco-2
	Log ₂	Log ₂
	DFO/Control	DFO/Control
<i>mt</i>	2,1	SC
<i>ccs</i>	SC	SC
<i>aplp2</i>	SC	SC
<i>ftth1</i>	SC	SC
<i>ireg1</i>	SC	SC

DISCUSIÓN

A continuación se discuten los resultados obtenidos en relación a la hipótesis propuesta y su aporte al entendimiento del papel que desempeña la regulación transcripcional en el metabolismo celular de metales traza.

1. Características de la metodología utilizada.

Los tejidos hepático e intestinal juegan un papel fundamental en el control de la homeostasis sistémica de Cu y Fe. Por esta razón, las líneas celulares HepG2 (carcinoma hepatocelular) y Caco-2 (adenocarcinoma colorectal) han sido ampliamente utilizada en estudios enfocados a comprender la regulación del metabolismo de estos metales. Durante esta tesis se utilizaron ambas líneas celulares, las cuales fueron expuestas a una concentración supra-fisiológica de Cu:His, o a DFO, tratamientos que permitieron modificar el contenido y la relación de Fe, Cu y Zn en la célula, generando un incremento de Cu y una disminución en el contenido de Fe. Como el objetivo principal de este estudio fue determinar los efectos de estos tratamientos sobre las redes transcripcionales asociados al manejo de metales traza y la defensa del daño oxidativo, se midieron también algunos parámetros fisiológicos para evaluar estas variables y se analizó su relación con los cambios de abundancia de alguno de los transcritos seleccionados.

Las condiciones de cultivo fueron diseñadas con el fin de evitar la influencia de la diferenciación celular sobre cambios en la abundancia de transcritos asociados al metabolismo de metales, puesto que se ha reportado que genes vinculados al metabolismo de Fe, Cu y Zn son diferencialmente expresado en la línea celular Caco-2 a medida que las células alcanzan un estado de confluencia (Han y Wessling-Resnick, 2002; Bedrine-Ferran y col., 2004). En estos trabajos los autores observan, por ejemplo, que durante la diferenciación se produce un aumento en la abundancia relativa de *dmt1*, *heph*, *ireg1* y *tf* y una disminución en la abundancia de *abcb7* y *zrt1* (Han y Wessling-

Resnick, 2002; Bedrine-Ferran y col., 2004). En términos operacionales, en el presente estudio las células Caco-2 fueron mantenidas durante diecisiete días en post-confluencia tiempo en el cual la abundancia relativa de estos transcritos se ha estabilizado, o sea no se observan fluctuaciones de abundancia asociadas a la diferenciación celular (Han y Wessling-Resnick, 2002). Por su parte, las células HepG2 no muestran diferencias de abundancia asociadas a la diferenciación en los transcritos señalados, por lo cual luego de alcanzar un 80% de confluencia comenzó el periodo de tratamiento con Cu:His o DFO, el cual fue el mismo para todos los casos en ambos tipos celulares.

Los parámetros fisiológicos de células sometidas a tratamientos y sus controles se evaluaron en forma indirecta vía análisis colorimétricos, fluorimétricos y/o densitométricos utilizando igual número de células por ensayo. Sin embargo el tiempo de cultivo y el efecto de los tratamientos pudieron afectar diferencialmente el número final de células por lo que se procedió a normalizar los datos obtenidos en estos ensayos por el contenido de proteínas totales de cada muestra, parámetro que a nuestro juicio permite una comparación más adecuada entre muestras al final de los tratamientos. Por otra parte, los ensayos de expresión génica se realizaron mediante hibridaciones sobre membranas de nylon, en las cuales se sembraron los productos de PCR provenientes de la librería de transcritos completada durante esta tesis; estos productos fueron de tamaño variable promediando 845 pb y fueron amplificados utilizando partidores específicos para el inserto o partidores universales del vector. En la elección de los partidores se evitó amplificar productos de largo superior a 2,5 Kb, puesto que sobre esta longitud se produce una disminución en el rendimiento de amplificación realizada por la DNA polimerasa.

Finalmente, cabe señalar que un aspecto clave en el desarrollo del análisis de expresión génica vía macroarrays fue la optimización del protocolo de marcación de la sonda de hibridación. Inicialmente se utilizó un protocolo estándar de marcación de cDNA monohebra con [³²P] dCTP a partir de 500 ng de mRNA el cual fue extraído desde las células expuestas a Cu:His o DFO y sus controles. Sin embargo, la intensidad de las

señales de hibridación obtenidas fue débil lo que se tradujo en un bajo porcentaje de recuperación de puntos. Como el protocolo de hibridación utilizado estaba respaldado por reportes de varios procedimientos experimentales además de ser validado en ensayos previos realizados en nuestro laboratorio, se estimó que la principal razón que podría dar cuenta de la baja recuperación de señales de hibridación era una cantidad insuficiente de sonda radiactiva. Como la cantidad de mRNA suele ser limitante en este tipo de ensayos se tomó la decisión de mantener los 500 ng utilizados en los ensayos previos, a partir del cual se sintetizó un cDNA de doble hebra no radiactivo, donde teóricamente se duplica la masa del mRNA utilizado (D'Alessio y Gerard, 1988). A partir de este cDNA de doble hebra se realizó la síntesis de la sonda radiactiva, utilizando un protocolo de marcaje mediante el Kit Random Primers DNA Labeling System. Los esfuerzos puestos en el desarrollo de este nuevo protocolo permitieron generar una mayor masa de sonda radiactiva sin alterar las abundancias relativas de los transcritos presentes en la muestra original (Chenchik y col., 1998). La representatividad de cada transcrito en la muestra original ha sido verificada mediante la comparación de perfiles de expresión en experimentos de macroarrays y PCR cuantitativo en tiempo real, donde se utilizaron sondas de cDNA amplificado por este método y sondas obtenidas mediante una reacción estándar de transcripción reversa (Zhumabayeva y col., 2001; Seth y col., 2003).

2. Contenido de metales.

La concentración basal de Cu, Fe y Zn en el medio de cultivo utilizado para ambas líneas celulares fue 0,44, 2,69 y 3,8 μ M, respectivamente (Tapia y col., 2003). La concentración de Cu fue considerada como sub-fisiológicas dado los niveles plasmáticos encontrados en humanos (Uauy y cols., 1998; Linder y col., 1998). Las células tratadas con Cu:His mostraron incrementos significativos en el contenido intracelular de Cu en todos los tiempos medidos, lo cual indica que durante el tratamiento existió un saldo positivo entre el proceso de entrada y salida del metal. Esta observación sugiere que los mecanismos celulares involucrados en la homeostasis celular de Cu aun no logran

alcanzar un régimen de equilibrio, en este escenario nuestro estudio pretendió evaluar el papel que desempeña la regulación transcripcional en el proceso de adaptación a la exposición a Cu:His. Los resultados indican que para estos tiempos de exposición, el contenido intracelular de Cu entre las células tratadas y sus controles aumentó 14,7 (en HepG2) y 6,5 (en Caco-2) veces, lo cual es considerablemente menor a la diferencia de concentración de Cu que se establece entre el medio de cultivo basal y el medio suplementado con Cu:His (227 veces aproximadamente). Esto permite suponer que las células fueron capaces de regular el contenido intracelular del metal por medio de mecanismos vinculados a procesos de incorporación y/o eflujo de Cu.

Otro aspecto interesante de abordar fue que las células sometidas a tratamientos con Cu:His mostraron un incremento en la concentración intracelular de Cu concomitante con una disminución en el contenido de Fe (comparar resultados figuras 2A y 2C), en una magnitud similar a la reportada para ambas líneas celulares sujetas a equivalentes tratamientos (Arredondo y col., 2000; Tapia y col., 2003). Nosotros postulamos que esta relación inversa entre el contenido de Cu y Fe podría ser consecuencia de una competencia entre los metales por su incorporación a la célula vía DMT1 puesto que se ha reportado la capacidad de esta proteína de incorporar ambos cationes (Arredondo y col., 2003; Arredondo y col., 2005). Alternativamente y aunque la regulación de la expresión de *Ireg1* no es aún completamente conocida, recientemente se ha reportado que la exposición a concentraciones fisiológicas y supra-fisiológicas de Cu en líneas celulares Caco-2 y J774 (macrófagos) muestra un aumento en el contenido de su transcrito y proteína (Han y Wessling-Resnick, 2002; Cheng y col., 2004; Tennant y col., 2002), lo que sugiere un posible mecanismo de regulación del eflujo de Fe vinculado al aumento de la disponibilidad de Cu. Esta situación encuentra otro fundamento en dos reportes (Nozawa y col., 1999 y Oshiro y col., 2002) donde se muestra que tanto el Cu como otros metales son capaces de promover el ensamblaje del cluster Fe-S aun con bajos niveles de Fe, resultando en una disminución en la actividad de unión de la proteína IRP1 a sitios IRE. En el caso particular del mRNA de *ireg1* se ha descrito un motivo IRE

en su 5' UTR por lo que un ensamblaje del cluster Fe-S mediado por altas concentraciones intracelulares de Cu resultaría en una disminución de la unión de IRP1 al motivo IRE y un consecuente aumento de la abundancia de IREG1 en células sometidas a suplementos de Cu (Tennant y col., 2002; Han y Wessling-Resnick, 2002; Cheng y col., 2004). Sin embargo y considerando que existen datos que muestran un aumento en la abundancia de *ireg1* en correlación con la disminución de disponibilidad de Fe, en desacuerdo por lo predicho según el modelo IRE/IRP (McKie y col., 2000), no se puede descartar que el aumento en la abundancia del transcrito *ireg1* sea consecuencia de la disminución en el contenido de Fe debido a la competencia con Cu por DMT1, en situaciones de alta disponibilidad de Cu. En este contexto, nuestros resultados indican claramente que el RNA mensajero de *ireg1* aumenta su abundancia relativa en células HepG2 expuestas a 100 μ M de Cu:His respecto de células no expuestas, representando el primer reporte que describe esta situación en HepG2.

En células tratadas con DFO, el contenido intracelular de Fe disminuyó respecto al contenido de células no tratadas, en ambas líneas celulares. Esto sugiere que DFO redujo, como se esperaba, la concentración disponible del Fe presente en el medio de cultivo. El contenido intracelular de Cu también fue medido en células sometidas a este tratamiento, observándose un leve pero significativo aumento en ambas líneas celulares. Estos datos sugieren que la disminución en la disponibilidad de Fe puede contribuir a un aumento en el contenido de Cu, tal como se ha demostrado en estudios de privación dietaria de Fe en ratas, donde se observó un aumento en el contenido de Cu en hepatocitos y enterocitos, el que a su vez se asoció a una fuerte inducción de metalotioneínas, vinculadas al almacenamiento de Cu (Collins y col., 2005). Estos datos apoyan la idea que DMT1 participa en la absorción de Cu durante deficiencias de Fe (menor competencia con Fe). En este escenario la contribución de CTR1 es poco probable debido a que la expresión del gen que la codifica, no muestra inducción transcripcional durante privación de Fe (Collins y col., 2005) y su acción parece ser modulada por mecanismos post-transcripcionales (Guo y col., 2004).

Finalmente es importante destacar que tanto el tratamiento con Cu:His como con DFO fueron capaces de modificar el contenido intracelular de Cu, Fe y no el de Zn, como así también las relaciones de contenido que se establecen entre estos metales comparando la condición control con la de tratamientos y comparando entre tratamientos (Tablas 3 y 4), lo cual se correlaciona con las modificaciones de abundancia de los transcritos analizados, aspecto que se discutirá más adelante.

3. Producción de ROS, viabilidad celular y citoprotección vía MT.

Como se observa en las figuras 4 y 7, tanto el tratamiento con Cu:His como con DFO se correlacionó con un aumento en el contenido intracelular de Cu, en ambas líneas celulares respecto a la condición control. El aumento de la carga intracelular de Cu puede producir un efecto citotóxico debido a su capacidad de generar ROS mediante reacciones tipo Fenton (Halliwell y col., 1984; Aust y col., 1985; Halliwell y col., 1990), lo cual puede explicar el aumento en todos los casos de la acumulación de estos agentes oxidantes (Figuras 5A-B y 8A-B) y la disminución de la viabilidad celular (Figuras 5C-D y 8C). La excepción se produjo en células Caco-2 expuestas a DFO; aquí el aumento en la acumulación de ROS (correlacionado con un leve aumento en el contenido de Cu) no se correspondió con una disminución en la viabilidad celular (Figura 8D). En contraste, las células HepG2 expuestas a Cu:His muestran una disminución marginal en la viabilidad celular en comparación con observado con el tratamiento con DFO, donde la disminución en la viabilidad alcanza un 46 % respecto de las células control. Como los datos de viabilidad obtenidos mediante ensayos con MTT no permiten descartar que la disminución en la viabilidad observada se deba a un efecto antiproliferativo mediado por el Cu:His en células HepG2 (Aston y col., 2000), tampoco se puede descartar que la disminución observada en la viabilidad de células HepG2 expuestas a DFO se deba al mismo efecto antiproliferativo, pero en mayor intensidad como se ha reportado recientemente en hepatocitos y células HepG2 (Kim y col., 1994; Chenoufi y col., 1998), lo que podría explicar las diferencias de magnitud en la disminución de la viabilidad entre

tratamientos en HepG2. En este sentido, es importante destacar que este efecto antiproliferativo no debería afectar la viabilidad celular de Caco-2 bajo ningún tratamiento, puesto las condiciones de cultivo utilizadas para este tipo celular asegura un estado celular no proliferativo tanto para células controles como tratadas. Los antecedentes expuestos permiten proponer que en general para las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, existe una evidente correlación entre la acumulación de ROS y la disminución de la viabilidad celular, manteniendo presente que esta correlación no representa necesariamente una relación causal. Es posible por ejemplo, que la disminución de viabilidad se deba en todos los casos al efecto antiproliferativo del Cu:His y DFO sobre HepG2 y no a la acumulación de ROS, lo cual encuentra respaldo en la ausencia de efecto de estas especies oxidantes sobre la viabilidad de Caco-2 expuestas a DFO (Figura 8D). Otro antecedente interesante a señalar es que en ninguna línea celular se observaron diferencias significativas entre tratamientos con Cu:His y DFO al comparar los niveles de acumulación de ROS con la condición control, a pesar que los contenidos de Cu intracelular son significativamente mayores en células tratadas con el metal que con el quelante. Esto sugiere que leves niveles de aumento en el contenido de Cu, similares a los alcanzados con el tratamiento con DFO, podrían ser suficientes para alcanzar (o detectar) un máximo de acumulación de ROS bajo las condiciones utilizadas en este estudio.

Finalmente, como varias líneas de evidencia han mostrado, el contenido intracelular de MT se correlaciona directamente con la resistencia a la exposición a Cu (Thiele y col., 1986; Kawai y col., 2000), desempeñando una función de almacenamiento seguro del Cu intracelular y una consecuente citoprotección (Tapia y col., 2004). De acuerdo a esto, nuestros resultados indican que tanto el transcrito como la proteína MT aumentan su abundancia en respuesta al metal, lo cual fue considerado un control positivo del efecto de los tratamientos sobre la expresión génica.

4. Análisis de expresión génica.

La tecnología de hibridación en matrices es una de las técnicas con mayores proyecciones en todo el ámbito biotecnológico surgida en los últimos años. Su versatilidad y su bajo costo relativo a la cantidad de información que puede aportar son sus principales ventajas. En el desarrollo de esta tesis, fue una herramienta importante para la medición de la expresión de los genes bajo las condiciones especificadas. Si bien la literatura es abundante en cuanto a las aplicaciones de esta técnica, también lo son las distintas formas de extracción, tratamiento y análisis de los datos obtenidos. Los protocolos de extracción y tratamiento de los datos fueron implementados y ajustados en esta tesis en función de las problemáticas a resolver y las preguntas que se abordaron.

La hibridación en matrices se desarrolló generando seis réplicas por punto de hibridación, las cuales se originan a partir de siembras en duplicado de los productos de PCR de interés hibridados con tres réplicas biológicas provenientes de células HepG2 no expuestas o suplementadas durante 24 h con 100 μ M de Cu:His o por 48 h con 100 μ M de DFO. Cada producto de PCR fue sembrado en dos concentraciones diferentes, lo cual permitió contar con doce datos de expresión por gen. Esta estrategia permitió rescatar en promedio entre el 60 y 70 % de los datos en ambos tipos de membranas, luego de aplicar los criterios de calidad, lo cual confirió un mayor nivel de confianza estadística a los resultados obtenidos. Por otra parte, la alta reproducibilidad de los ensayos de hibridación y el método de normalización utilizado permitió realizar comparaciones confiables entre membranas hibridadas en eventos distintos.

Los análisis realizados con *gpdh* para normalizar los datos provenientes de los distintos tratamientos, indican que *gpdh* no es apropiado como referencia interna para normalizar datos obtenidos en los tratamientos con DFO, puesto que nuestros resultados sugieren que la exposición al quelante induce la expresión de este transcrito; lo que está de acuerdo con similares observaciones anteriormente reportadas (Nakai y col., 1991). Por esta razón, *act β* fue utilizado en la normalización de datos obtenidos desde los tratamientos con DFO y también para los obtenidos en los tratamientos con Cu:His como

se muestra en las tablas 6, 7 y 8. Cabe destacar que los datos provenientes de los tratamientos con Cu:His fueron normalizados también por *gpdh* encontrándose las mismas tendencias de cambio para todos los transcritos que cambiaron su abundancia relativa frente a la condición control y en similares magnitudes, (estos datos no fueron incluidos en la tesis). En su conjunto, estos análisis permitieron identificar quince genes que cambian significativamente su nivel de abundancia con el tratamiento con Cu:His respecto a la condición de referencia, dentro de los cuales se encuentran genes vinculados al metabolismo de Cu, Fe, Zn y defensa contra el daño oxidativo (Tabla 6). Por su parte, dieciocho genes cambiaron significativamente con el tratamiento con DFO respecto a la condición de referencia, entre los cuales también se encuentran genes vinculados a los metabolismos señalados (Tabla 7). Entre ambos tratamientos, el número de genes que mostraron modificaciones en el nivel de abundancia de sus transcritos respecto de la condición control fueron veintiuno, para los cuales se presenta a continuación una pequeña reseña.

1. *mt* codifica para la proteína metalotioneína (MT), la que ha sido involucrada con la desintoxicación de metales. Juega un rol importante en la mantención de la homeostasis de Cu y Zn durante el desarrollo y protege contra ROS (Karin y Richards, 1982; Tapia y col., 2004).
2. *app* codifica para la proteína precursora del amiloide (APP), proteína de transmembrana que ha sido vinculada a la enfermedad de Alzheimer (Glennner y Wong, 1984). Se ha demostrado que su dominio de unión a Cu podría estar involucrado en la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} (Multhaup y col., 1996).
3. *sco1* codifica para la proteína SCO1. Se ubica en la membrana interna mitocondrial, posiblemente cumpliendo funciones en el transporte de Cu o en la inserción del metal al sitio activo de la proteína CCO. Está predominantemente expresado en tejidos con alta tasa de fosforilación oxidativa, como músculos, corazón y cerebro (Petruzzella y col., 1998).

4. ***prnp*** codifica para la proteína prión (PrPc), la cual ha sido implicada en encefalopatías espongiformes neurodegenerativas. La proteína humana no patogénica es una glicoproteína anclada a la membrana plasmática, caracterizada por su estructura de alfa-hélices, que contrasta con la estructura rica en sábanas beta-plegadas de su isoforma patogénica (Vanik and Surewicz, 2002).
5. ***cp*** codifica para la proteína ceruloplasmina (Cp) conocida por su función ferroxidasa. La proteína humana es una glicoproteína que une 90-95% del Cu plasmático y une entre 6 y 7 átomos de Cu por molécula. Se ha establecido que la expresión génica tejida específica de Cp es esencial para la homeostasis de Fe y la supervivencia neuronal (Klomp and Gitlin, 1996).
6. ***ccs*** codifica para la proteína chaperona de Cu de SOD1 (CCS). Ensayos de unión y co-inmunoprecipitación indican que SOD1 y CCS interactúan directamente *in vitro* e *in vivo* vía dominios homólogos presentes en cada proteína, lo que posibilita la transferencia del Cu de CCS a SOD1. Análisis de Northern blot revelan que CCS se expresa de forma ubicua como un mRNA de 1,2 Kb (Casareno y col., 1998).
7. ***aplp2*** codifica para la proteína similar a la proteína precursora del amiloide 2 (APLP2). Esta proteína contiene un segmento de alta identidad con el dominio de transmembrana-citoplasmático de APP encontrado en placas cerebrales de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Yan y col., 1990). Además, se ha reportado una posible función en la mantención de la homeostasis de Cu en cerebro e hígado, asociado a su dominio de unión a Cu (White y col., 1999).
8. ***atox1*** codifica para la proteína ATOX1 (HAH1) que posee un 47% de identidad y un 58% de similitud a su homóloga en levaduras ATX1, incluyendo tanto el dominio de unión a Cu como el C-terminal rico en lisinas. Análisis de Northern blot muestran que *atox1* posee un transcrito de 0,5 Kb abundante y ubicuamente expresado. Además, se ha propuesto que esta proteína actúa como chaperona de

Cu a las ATPasas de la red trans-Golgi, Menkes y Wilson, y posee una posible actividad en la defensa celular antioxidante (Klomp y col., 1997).

9. **sod1** codifica para la proteína citoplasmática de bajo peso molecular Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1), la cual cataliza la reacción de dismutación del anión superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, formando parte de la red de proteínas encargadas de la defensa celular antioxidante (Fridovich, 1975). Mutaciones en esta proteína se han asociado con la enfermedad neurodegenerativa esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Rosen y col., 1993).
10. **hmox1** codifica para la proteína heme oxigenasa 1 (HMOX1), esencial en el catabolismo del grupo heme. La actividad de esta proteína y la expresión de su mRNA se ha visto inducida por el grupo heme y por varias sustancias no hemínicas (Yoshida y col., 1988), que han permitido asociarle una función antioxidante. Además, se ha mostrado en estudios de inmunoprecipitación que APP se une a HMOX1 inhibiendo su actividad heme oxigenasa *in vitro* (Takahashi y col., 2000). Recientemente se mostró la inducción de su mRNA en células HepG2 cultivadas bajo suplemento supra-fisiológico de Cu (Song y Freedman, 2005)
11. **abcb7** codifica para la proteína cassette de unión a ATP, subfamilia B, miembro 7 (ABCB7). Esta proteína contiene 752 aminoácidos, 4 dominios transmembrana y una secuencia de destinación mitocondrial. Análisis de Northern blot en tejidos humanos muestra un transcrito único de 2,6 Kb el cual es fuertemente expresado en músculo esquelético y corazón. Se ha propuesto que ABCB7 podría estar involucrado en la mantención de la homeostasis de metales (Savary y col., 1997) vía el transporte del grupo heme desde las mitocondrias al citosol (Shimada y col., 1998).
12. **hepc** codifica para el péptido antimicrobial hepcidina (HEPC-HAMP). Este péptido es un importante y conservado componente del sistema inmune innato en algunas especies, encontrándose altamente expresado en hígado. Recientemente se ha

reportado que HEPC regula post-traduccionamente a IREG1, el único exportador de Fe conocido, participando de este modo en la regulación de la absorción intestinal de Fe y en la distribución de este metal hacia los diferentes tejidos (Nemeth y col., 2004).

13. *tf* codifica para la glicoproteína transferrina (TF), la cual está constituida por una cadena polipeptídica de 679 aminoácidos. Esta proteína está encargada del transporte plasmático de Fe desde el intestino, sistema reticuloendotelial y células parenquimáticas del hígado a todo el resto de las células del cuerpo (Yang y col., 1984). La incorporación celular de Fe^{+3} vía TF se produce por la internalización de esta proteína junto a su receptor, que luego de entregar el Fe^{+3} , se recicla en forma de apo-TF hacia la membrana plasmática (Cheng y col., 2004).
14. *ftl* codifica para el polipéptido liviano de la proteína ferritina (FTL) (Watanabe y Drysdale, 1981). Esta proteína es el principal componente de almacenaje intracelular de hierro en todos los organismos. Estudios de síntesis de ferritina en sistemas libres de células sugieren que sus cadenas livianas y pesadas poseen diferentes transcritos. Una mutación en su elemento de respuesta a hierro (IRE) en la región no codificante de su mRNA ha sido vinculado con el síndrome de hiperferritinemia (Beaumont y col., 1995).
15. *fxn* codifica para la proteína frataxina (FRDA), localizada en la membrana y en las crestas mitocondriales (Campuzano y col., 1997). Se ha reportado que cada molécula de frataxina humana es capaz de unir cinco átomos de Fe (Cavadini y col., 2002), vinculándola con una posible función de chaperona de Fe que evita el desensamblaje del grupo $[4Fe-4S]^{2+}$ de la aconitasa (Bulteau y col., 2004). Su sobreexpresión incrementa la defensa celular antioxidante (Shoichet y col., 2002) y mutaciones en este gen pueden causar una forma de ataxia de Friedreich.
16. *tfr2* codifica para la proteína receptor de transferrina 2 (TfR2) que se encuentra predominantemente expresada en hepatocitos y se ha postulado como un segundo receptor de transferrina que puede mediar el transporte celular de hierro

(Kawabata y col., 1999). Este receptor podría estar mediando la incorporación de hierro vía TF cuando el receptor de transferrina 1 (TfR1) está reprimido en hepatocitos de pacientes con hemocromatosis hereditaria (Fleming y col., 2000).

17. *heph* codifica para la proteína hefaestina (HEPH) homóloga a Cp, razón por la cual se ha propuesto que hefaestina es una ferroxidasa necesaria para exportar el hierro desde las células del epitelio intestinal. En contraste con Cp, esta proteína contiene un dominio transmembrana lo cual sugiere que se localiza en la superficie de la célula (Vulpe y col., 1999).
18. *cubn* codifica para la proteína cubilina (CUBN). Cubilina es una proteína de 460 KDa que funciona como un receptor endocítico del factor intrínseco del complejo vitamínico B₁₂ en el intestino y como receptor de apolipoproteína A1. También ha sido involucrado en la reabsorción de albúmina en el túbulo proximal del riñón y es considerado el tercer receptor TF descrito, siendo relevante para la incorporación de Fe en el riñón (Kozyraki y col., 2001).
19. *hfe* codifica para la proteína hemocromatosis (HFE). Se ha mostrado que HFE co-localiza y está asociada físicamente con el receptor 1 de TF (TfRC) y con beta-2-microglobulina (B2M). Además, se ha propuesto que HFE podría modular la incorporación celular de hierro unido a TF y participar como receptor de los niveles de Fe sistémico (Waheed y col., 1999).
20. *ireg1* codifica para la proteína ferroportina (IREG1), la que ha sido reportada como la primera proteína de eflujo de Fe (McKie y col., 2000). La regulación de su expresión es desconocida y ha mostrado ser tipo celular específica, puesto que en enterocitos, la deficiencia de Fe induce su expresión mientras que en macrófagos la deficiencia de Fe la disminuye (Yang y col., 2002).
21. *gpdh* codifica para la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), la que cataliza un paso de producción energética en el metabolismo de carbohidratos y se ha postulado como un posible receptor de estrés oxidativo

durante la apoptosis temprana (Chuang y col., 2005). Estudios con algunos quelantes de hierro han mostrado una inducción de su mRNA (Nakai y col., 1991).

Estos genes se han vinculado clásicamente al metabolismo de Cu, Fe o defensa contra el daño oxidativo. En esta tesis los genes fueron agrupados en categorías arbitrarias según la función asignada a su producto proteico (Tabla 5), sin embargo, es importante señalar que algunos de ellos muestran características que les permitiría ser agrupados en otras categorías. Por ejemplo, *mt*, *atox1*, *sod1* y *hmx1* han sido también vinculados a la defensa contra el daño oxidativo y en esta tesis fueron clasificados como vinculados al metabolismo de Cu y Fe.

Estos veintiún genes se agruparon en tres categorías, 1) Cambian exclusivamente con el tratamiento con Cu:His, 2) Cambian exclusivamente con el tratamiento con DFO o 3) Cambian con ambos tratamientos (Figura 19). Dentro del primer grupo se encontró el transcrito de *ccs*, *abcb7* e *ireg1*. De estos genes el aumento en la abundancia del transcrito de *ccs* era esperado dado un reporte en fibroblastos de ratón suplementados con concentraciones supra-fisiológicas de Cu (Tapia y col., 2004). Por su parte, aunque *ireg1* a sido vinculado a la exportación de Fe, recientes reportes han mostrado que su regulación puede estar asociada al estatus de Cu intracelular en macrófagos (Chung y col., 2004), mientras que hasta donde conocemos el cambio mostrado por *abcb7* representa el primer reporte de regulación transcripcional asociado a metales. En conjunto, los datos permiten sugerir que este grupo de genes no ve afectada la abundancia de sus transcritos en función de la disminución del contenido intracelular de Fe ni se correlaciona con el aumento en la acumulación de ROS (por no mostrar variaciones para los tratamientos con DFO). Esto permite sugerir que el alto contenido intracelular de Cu puede interferir en que los mecanismos que revelan cambios en el nivel intracelular de Fe, como las proteínas IRPs, detecten la baja en su contenido.

El segundo grupo de genes corresponden a aquellos que cambian exclusivamente con DFO. Entre estos encontramos a *tfr2*, *heph*, *cubn*, *hfe* y *gpdh*. Para ninguno de estos

genes se ha reportado elementos de respuesta a hierro (IRE), lo cual nos lleva a suponer que el sistema IRE/IRP no participaría de la regulación de la abundancia de sus transcritos. Entre los resultados que concuerdan con los datos reportados para este grupo de genes bajo similares tratamientos, se encuentra la disminución en la abundancia del transcrito de *hfe* (Han y col., 1999) y el aumento en la abundancia del transcrito de *gpdh* en células expuestas a un quelante de Fe (Nakai y col., 1991).

A pesar de que el contenido intracelular de Fe exhibido, para ambos tratamientos (Cu:His o DFO) utilizados en ensayos de expresión génica, fueron prácticamente idénticos (Figura 4), las relaciones encontradas entre la abundancia de Cu y Fe intracelular fueron diferentes comparando entre tratamientos (Tabla 3). Esto sugiere que los genes clasificados en este grupo se diferencian de aquellos clasificados en el primero, no por su contenido intracelular de Fe, sino que por la configuración diferencial de metales entre tratamientos, lo cual está mediado principalmente por las diferencias en el contenido de Cu. Por lo tanto, esto permite plantear que la regulación de la abundancia de algunos transcritos vinculados al metabolismo de metales depende no sólo del contenido intracelular de alguno de los metales en particular, sino también de las relaciones de abundancia que se establecen entre ellos.

El último grupo, que comprende genes que cambian con ambos tratamientos, puede separarse en tres subgrupos, a) aumentan su abundancia con ambos tratamientos b) disminuyen su abundancia con ambos tratamientos y c) aumentan su abundancia con Cu:His y la disminuyen con DFO. En el primer subgrupo se encuentran *mt*, *app*, *sco1*, *tf*, *atox1*, *cp* y *apl2*, todos vinculados al metabolismo de Cu, excepto *tf*. Estos podrían estar inducidos directamente por el aumento en la abundancia de ROS o ser sensibles a pequeños aumentos en el contenido intracelular de Cu, como los registrados en células expuestas a DFO. Estos argumentos son apoyados por algunos estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran la inducción de alguno de estos genes por estrés oxidativo o en respuesta a pequeñas modificaciones en el contenido intracelular de Cu (Klomp y col., 1997; Andrews, 2000; Zhang y col., 2003). El segundo subgrupo comprende genes que

se reprimen con ambos tratamientos, entre lo que encontramos a *ftl* y *fxn*. La regulación de la expresión de estos transcritos podría vincularse con la disminución en el contenido de Fe, con un aumento en el contenido de Cu o con el aumento en la abundancia de ROS, observados en células sometidas a ambos tratamientos. A pesar de la tendencia a la baja en la acumulación de estos transcritos, cabe señalar que un reciente reporte caracterizó un putativo motivo ARE en la región promotora del gen que codifica para *ftl*, el cual es indicado como un elemento de respuesta a estrés oxidativo (Hintze y Theil, 2005). Este antecedente reafirma la condición de que la mayoría de los genes clasificados en este grupo pueden estar regulados transcripcionalmente en respuesta a estrés oxidativo y destaca la noción de que genes vinculados al metabolismo de Fe, además de modificar la abundancia de sus transcritos mediante mecanismos post-transcripcionales (IRE/IRP), también lo pueden hacer en función de mecanismos de regulación transcripcional.

En el último subgrupo de genes encontramos a *hmox1*, *sod1*, *hepc*, y *prpc*. Entre estos, tanto *hmox1* como *sod1* han mostrado inducción de su expresión frente a la exposición a Cu o a agentes oxidantes (Fridovich, 1975; Song y Freedman, 2005), encontrándose sitios reguladores de respuesta a estrés en sus regiones promotoras, por lo que de acuerdo a los resultados mostrados en las figuras 5A y 5B, se esperaba un aumento de la abundancia de sus transcritos con ambos tratamientos. Por su parte, se sabe que la proteína prion, que también se ha vinculado a estrés oxidativo, une Cu *in vivo* (Brown y col., 1997) pero una posible regulación de su expresión asociada a este metal no ha sido descrita. Los resultados obtenidos en este estudio no clarifican este punto, puesto que como se ha indicado este transcrito mostró un aumento de su abundancia en células expuestas a Cu:His y una disminución en células expuestas a DFO. Finalmente, *hepc* muestra la misma tendencia a pesar que los cambios de abundancia esperados para estos genes con ambos tratamientos estaban orientados a un aumento del nivel de su transcrito, (como para *hmox1* y *sod1*) correlacionándose con la disminución intracelular de Fe (Gehrke y col., 2003) o el aumento de ROS. Las tendencias divergentes en la abundancia de estos transcritos entre tratamientos no son explicados

por los factores hasta aquí considerados, de hecho cuando se analiza la disminución en la viabilidad celular entre tratamientos en HepG2, estos no se correlacionan en forma proporcional con el aumento de ROS, la disminución del contenido de Fe ni el aumento de Cu. Esto supone la influencia de algunos factores no considerados que podrían influir sobre la regulación transcripcional de algunos genes analizados. Por ejemplo, se ha descrito que la expresión de *hmx1* podría ser regulada por Cu, Fe hemínico, compuestos polifenólicos e incluso por toxinas ambientales (Song y Freedman, 2005; Yoshida y col., 1988; Alam y Cook, 2003); *sod1* se ha visto regulado por Cu, ROS, ácido araquidónico, óxido nítrico y AMPc (Tapia y col., 2003; Yoo y col., 1999; Frank y col., 2000; Minc y col., 1999); *prnp* por el factor de crecimiento NGF y por ácido retinoico (Mobley y col., 1988; Dodelet y Cashman, 1998) mientras que *hepc* ha mostrado regulación dependiente de agentes inflamatorios e inductores de hipoxia (Nicolas y col., 2002). Por lo tanto, es importante destacar que en este grupo de genes donde se ve modificada la abundancia de sus transcritos con ambos tratamientos, además de ser posiblemente regulados por ROS (como se ha descrito para la mayoría de ellos), el último subgrupo podría estar regulado por factores no considerados en este estudio, puesto que aún no se ha descrito completamente la función de alguno de ellos y/o están involucrados en procesos alternativos al metabolismo de metales. Además, como se sugirió para algunos genes clasificados en el primer y segundo grupo, la regulación transcripcional de genes clasificados en este subgrupo también puede estar influenciada por las diferencias en las relaciones de contenido de metales entre tratamientos. Considerando que SOD1 utiliza Cu y Zn como cofactor, es posible que el modelo planteado por Zhang y col., 2003 justifique las diferencias en las tendencias encontradas entre tratamientos, basándose en las diferencias encontradas en las relaciones de contenido de Cu y Zn entre los tratamientos con Cu:His y DFO en HepG2 (Tabla 3). Este modelo plantea que un aumento intracelular de Cu (probablemente de la magnitud encontrada sólo en los tratamientos con Cu:His) desplaza el Zn unido a MT, el cual queda disponible para ser unido al regulador transcripcional de respuesta a metales MTF1 que a su vez se une a

sitios cis MRE transcribiendo los genes encontrados río abajo del inicio de la transcripción. Entre los genes que han mostrado este sistema de regulación en eucariontes se encuentran *zirtl*, *gcs* y *mt* (Mueller-Storm y col., 1989, Gunes y col., 1998, Lichtlen y col., 2001, Langmade y col., 2000) los cuales formaron parte del macroarray pero sólo *mt* superó los filtros de selección de señales confiables.

Finalmente, las verificaciones de los cambios de abundancia relativa fueron realizadas en células HepG2 y Caco-2 por PCR en tiempo real, validando los datos obtenidos en los ensayos de macroarrays. Además, se encontraron diferencias tipo celular - específicas, las cuales concuerdan con algunos reportes que señalan diferencias tejido específicas en la regulación transcripcional de genes asociados a la mantención de la homeostasis de metales. Por lo tanto, suponemos que las diferencias de respuesta transcripcional a la exposición a Cu:His o DFO bajo las condiciones utilizadas, podrían ser consecuencia de sensibilidades diferenciales a las configuraciones entre metales y/o a las diferencias de abundancias relativas de algunos transcritos que codifican para proteínas claves en la regulación del metabolismo de estos metales. Por ejemplo, en la condición basal de cultivo el número de transcritos de *ireg1* y *dmt1* están representados entre 17 y 12 veces más en células Caco-2 que en HepG2 respectivamente. El número de transcritos de *mt* en células HepG2 fue de $2,3 \times 10^{-3}$, mientras que en Caco-2 fue de $1,2 \times 10^{-5}$, lo que representa una diferencia de aproximadamente 200 veces en la abundancia de este transcrito. Considerando la relevancia que tiene MT en el metabolismo de Cu, estas diferencias pueden ser determinantes para dar cuenta de la homeostasis del metal, puesto que se ha considerado como un elemento clave en la regulación transcripcional de otros genes asociados tanto al metabolismo de Cu como de otros metales traza (Zhang y col., 2003, Tapia y col., 2004).

CONCLUSIONES

El clonamiento de quince genes y la verificación de cuarenta y cuatro clones permitió completar una librería de cDNAs y realizar ensayos de hibridación en macroarrays, lo cual permitió evaluar la expresión de genes vinculados al metabolismo de metales o defensa contra el daño oxidativo en respuesta a Cu.

Mediante el uso de hibridaciones en matrices, optimizadas para alcanzar los objetivos de esta tesis, se determinó que el 50 % de los genes pertenecientes a la genoteca y que representaron preguntas en este estudio, cambiaron significativamente la abundancia relativa de sus transcritos en respuesta a Cu y/o DFO. Además fue posible determinar que el aumento en la disponibilidad extracelular de Cu afectó la abundancia relativa de transcritos que codifican para proteínas vinculadas al metabolismo del propio Cu como también del Fe en células HepG2.

Con el objetivo de proponer algunas explicaciones para las variaciones en la abundancia de los transcritos observadas en los ensayos de hibridación, se determinó el contenido intracelular de metales, la acumulación de ROS y los niveles de MT. Los resultados indicaron que, tanto en células HepG2 como en Caco2, la exposición a Cu:His o DFO se correlacionó con modificaciones en el contenido intracelular de Cu, Fe y no con el de Zn, respecto a las células no tratadas. Sin embargo, al comparar entre tratamientos se observaron relaciones de abundancia diferenciales entre los metales, las cuales se explicaron principalmente por las diferencias en el contenido de Cu. Este aspecto resultó relevante por cuanto permitió plantear que la regulación de la abundancia de algunos transcritos vinculados al metabolismo de metales depende no sólo del contenido intracelular de algún metal en particular, sino también de las relaciones de abundancia que se establecen entre metales, lo cual es también dependiente del tipo celular en cuestión. Por otra parte, ambos tratamientos se correlacionaron con un aumento en la acumulación de ROS en células HepG2, lo que permitió sugerir que un amplio número de

transcritos asociados al metabolismo de Cu podrían estar regulados directamente por estas especies oxidantes.

La importancia de la determinación de los efectos de los tratamientos sobre la abundancia del transcrito *mt* y de la proteína MT radicó en la relevancia que se le ha atribuido en la regulación transcripcional de genes asociados al metabolismo de Cu y otros metales traza; de esta forma ambos tratamientos se correlacionaron con un aumento de su abundancia en HepG2, lo que permitió tener un control experimental de los efectos a nivel transcripcional del suplemento con Cu, previo a los ensayos de hibridación. Adicionalmente, las diferencias de abundancia del transcrito *mt* y de la proteína MT, entre líneas celulares, nos permitieron sugerir alguna asociación entre ésta proteína y la aparente regulación transcripcional tipo-celular específica detectada mediante análisis cuantitativos de abundancia de algunos transcritos.

Este estudio, sumado a la amplia información asociada al entendimiento de la función de estos metales en los organismos vivos, permiten concluir que además de poseer componentes comunes asociados a su metabolismo, la regulación de la expresión transcripcional de sus genes puede estar modulada por el contenido relativo de un metal con respecto a otro y por la acción de agentes oxidantes dentro de la célula.

REFERENCIAS

- Alam, J., Cook, J. 2003. Transcriptional Regulation of the Heme Oxygenase-1 Gene Via the Stress Response Element Pathway. *Curr. Pharmaceut. Des.* **9**:2499-2511.
- Andrews, G. 2000. Regulation of Metallothionein Gene Expression by Oxidative Stress and Metal Ions. *Biochem. Pharm.* **59**:95-104.
- Arredondo, M., Uauy, R., González, M. 2000. Regulation of copper uptake and transport in intestinal cell monolayers by acute and chronic copper exposure. *Biochim. Biophys. Acta.* **1474**:169-176.
- Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C., Nuñez, M.T. 2003. DMT1, a physiologically relevant apical Cu^{+1} transporter of intestinal cells. *Am. J. Physiol.* **284**:C1525-C1530.
- Arredondo, M., Nuñez, M. 2005. Iron and copper metabolism. *Mol. Aspect. Med.* **26**:314-328.
- Arredondo, M., Martínez, R, Nuñez, M.T., Ruz, M., Olivares, M. 2006. Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biol. Res.* **39**:95-102.
- Aston, N., Watt, N., Morton, I., Tanner, M., Evans, G. 2000. *Hum. Exp. Toxicol.* **19**:367-376.
- Aust, S., Morehouse, L., Thomas, C. 1985. Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free. Radic. Biol. Med.* **1**:3-25.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. y Struhl, K. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*, Third ed. (eds.) John Wiley and Sons.
- Barnum-Huckins, K., Adrian, G. 2000. Iron regulation of transferrin synthesis in the human hepatoma cell line HepG2. *Cell. Biol. Int.* **24**:71-77.
- Baumann, H., Gauldie, J. 1994. The acute phase response. *Immunol. Today.* **15**:74-80.
- Beaumont, C., Leneuve, P., Devaux, I., Scoazec, J., Berthier, M., Loiseau, M., Grandchamp, B., Bonneau, D. 1995. Mutation in the iron responsive element of the L ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract. *Nature Genet.* **11**: 444-446.
- Bedrine-Ferran, H., Le Meur, N., Gicquel, I., Le Cunff, M., Soriano, N., Guisle, I., Mottier, S., Monnier, A., Teusan, R., Fergelot, P., Le Gall, J., Leger, J., Mosser J. 2004. Transcriptome variations in human CaCo-2 cells: a model for enterocyte differentiation and its link to iron absorption. *Genomics.* **83**:772-89.
- Bittel, D., Dalton, T., Samson, S., Gedamu, L., Andrews, G. 1998. The DNA binding activity of metal response of element-binding transcription factor 1 is activated *in vivo* and *in vitro* by zinc, but not by other transition metals. *J. Biol. Chem.* **273**:7127-7133.
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., Kretzschmar, H. 1997. The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature.* **390**:684-687.

- Brown, D.R. 1999. Prion protein expression aids cellular uptake and veratridine-induced release of copper. *J. Neurosci. Res.* **58**:717-725.
- Bulteau, A., O'Neill, H., Kennedy, M., Ikeda-Saito, M., Isaya, G., Szweda, L. 2004. Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science.* **305**:242-245.
- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S., Faucheux, B., Trouillas, P., Authier, F., Durr, A., Mandel, J., Vescovi, A., Pandolfo, M., Koenig, M. 1997. Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum. Molec. Genet.* **6**:1771-1780.
- Casareno, R., Waggoner, D., Gitlin, J. 1998. The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **273**:23625-23628.
- Cavadini, P., O'Neill, H., Benada, O., Isaya, G. 2002. Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedrich ataxia. *Hum. Molec. Genet.* **11**:217-227.
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S., and Walz, T. 2004. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell.* **116**:565-576.
- Chenchik, A., Zhu, Y., Diatchenko, L., Li, R., Hill, J., Siebert, P. 1998. Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*. BioTechniques Books: pp. 305-319.
- Chenoufi, N., Drenou, B., Loreal, O., Pigeon, C., Brissot, P., Lescoat, G. 1998. Antiproliferative effect of deferiprone on the Hep G2 cell line *Biochem. Pharm.* **56**:431-437.
- Chuang, D., Hough, C., Senatorov, V. 2005. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**:269-90.
- Chung, J., Haile, D., Wessling-Resnick, M. 2004. Copper-induced ferroportin-1 expression in J774 macrophages is associated with increased iron efflux. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **101**: 2700-2705
- Collins, J., Franck, C., Kowdley, K., Ghishan, F. 2005. Identification of differentially expressed genes in response to dietary iron deprivation in rat duodenum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **288**:G964-G971.
- Coyle, P., Philcox, J., Carey, L., Rofe, A. 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**:627-647.
- Crichton, R., Pierre, J. *Old Iron, Young Copper: from Mars to Venus.* 2001. *Biometals.* **14**:99-112.
- Daffada, A., Young, S. 1999. Coordinated regulation of ceruloplasmin and metallothionein mRNA by interleukin-1 and copper in HepG2 cells. *FEBS Lett.* **457**:214-218.
- D'Alessio, J., Gerard, G. 1988. Second-strand cDNA synthesis with *E. coli* DNA polymerase I and RNase H: the fate of information at the mRNA 5' terminus and the effect of *E. coli* DNA ligase. *Nucleic Acids Res.* **16**:1999-2014.

- Dodelet, V., Cashman, N. 1998. Prion Protein Expression in Human Leukocyte Differentiation. *Blood*. **91**:1556-1561.
- Fleming, R., Migas, M., Holden, C., Waheed, A., Britton, R., Tomatsu, S., Bacon, B., Sly, W. 2000. Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **97**:2214-2219.
- Foury, F., Talibi, D. 2001. Mitochondrial control of iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **276**:7762-7768.
- Fox, P. 2002. The copper-iron chronicles: the story of an intimate relationship. *BioMetals*. **16**:9-40.
- Frank, S., Kampfer H., Podda, M., Kaufmann, R., Pfeilschifter, J. 2000. Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: Implications for keratinocyte proliferatio. *Biochem. J.* **346**:719-728.
- Freeman, W., Robertson, D., Vrana, K. 2000. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *BioTechniques*. **29**:1042-1055.
- Fridovich, I. 1975. Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* **44**:147-159.
- Garrick, M., Nuñez, M., Olivares, M., Harris, E. 2003. Parallels and contrasts between iron and copper metabolism. *BioMetals*. **16**:1-8.
- Gehrke, S., Kulaksiz, H., Herrmann, T., Riedel, H., Bents, K., Veltkamp, C., Stremmel, W. 2003. Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. *Blood*. **102**:371-376.
- Glenner, G. and Wong, C. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**:885-890.
- González, M., Tapia, L., Alvarado, M., Tornero, J., Fernández, R. 1999. Intracellular determination of trace elements by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry in mammalian cultured cells. *J. Anal. At. Spectrom.* **14**:885-888.
- González-Agüero, M., Zuñiga, A., Pottstock, H., del Pozo, T., González M., Cambiazo, V. 2005. Identification of genes expressed during *Drosophila melanogaster* gastrulation by using subtractive hybridization. *Gene*. **345**:213-224.
- Gross, C., Kellehe, M., Iyer, V., Brown, P., Winge, D. 2000. Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J. Biol. Chem.* **275**:32310-32316.
- Gubler, C., Lahey, M., Chase, M., Cartwright, G., Wintrobe, M. 1952. Studies on copper metabolism. III. The metabolism of iron in copper deficient swine. *Blood*. **7**:1075-1092.
- Gunes, C., Huechel, R., Georgies, O., Muller, K., Lichtlen, P., Bluthmann, H., Marino S., Aguzzi, A., Schaffner, W. 1998. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *EMBO J.* **17**:2846-2854.

- Guo, Y., Smith, K., Lee, J., Thiele, D., Petris, M. 2004. Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human Ctr1 copper transporter. *J. Biol. Chem.* **279**:17428-17433.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and diseases. *Biochem. J.* **219**:1-4.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth. Enzymol.* **186**:1-85.
- Han, O., Fleet, J., Wood, R. 1999. Reciprocal Regulation of HFE and Nramp2 Gene Expression by Iron in Human Intestinal Cells. *J. Nutr.* **129**: 98-104.
- Han, O., Wessling-Resnick, M. 2002. Copper repletion enhances apical iron uptake and transepithelial iron transport by Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **282**:G527-33.
- Harada, M., Sakisaka, S., Yoshitake, M., Shakadoh, S., Gondoh, K., Sata, M., Tanikawa, K. 1993. Biliary copper excretion acutely and chronically copper-loaded rats. *J. Hepatol.* **17**:111-117.
- Harris, E. 1995. The iron-copper connection: the link to ceruloplasmin grows stronger. *Nutr. Rev.* **53**:170-173.
- Hentze, M., Muckenthaler, M., Andrews, N. 2004. Balancing Acts: Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism. *Cell.* **117**:285-297.
- Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M., Schaffner, W. 1994. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metals-induced metallothionein gene expression. *EMBO J.* **13**:2870-2875.
- Hintze, K., Theil, E. 2005. DNA and mRNA elements with complementary responses to hemin, antioxidant inducers, and iron control ferritin-L expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**:15048-15052.
- Hu, L., Wang, J., Baggerly, K., Wang, H., Fuller, G., Hamilton, R., Coombes, K, Zhang, W. 2002. Obtaining reliable information from minute amounts of RNA using cDNA microarrays. *BMC Genomics.* **3**:16.
- Huffman, D., O'Halloran, T. 2001. Function, structure and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:677-701.
- Karin, M. and Richards, R. 1982. Human metallothionein genes: molecular cloning and sequence analysis of the mRNA. *Nucleic Acids Res.* **10**:3165-3173.
- Kawabata, H., Yang, R., Hiramata, T., Vuong, P., Kawano, S., Gombart, A., Koeffler, H. 1999. Molecular cloning of transferrin receptor 2: a new member of the transferrin receptor-like family. *J. Biol. Chem.* **274**:20826-20832.
- Kawai, K., Liu, S., Tyurin, V., Tyurina, Y., Borisenko, G., Jiang, J., St Croix, C., Fabisiak, J., Pitt, B., Kagan, V. 2000. Antioxidant and antiapoptotic function of metallothioneins in HL-60 cells challenged with copper nitrilotriacetate. *Chem. Res. Toxicol.* **13**:1275-86.
- Kim, D., Kim, W., Kang, J., Park, S., Kwon, O. 1994. The mechanism of antiproliferative effect of desferrioxamine on human hepatoma cell lines. *Yonsei. Med. J.* **35**:62-71.

- Klomp, L. and Gitlin, J. 1996. Expression of the ceruloplasmin gene in the human retina and brain: implications for a pathogenic model in aceruloplasminemia. *Hum. Molec. Genet.* **5**:1989-1996.
- Klomp, L., Lin, S., Yuan, D., Klausner, R., Culotta, V., Gitlin, J. 1997. Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J. Biol. Chem.* **272**:9221-9226.
- Knight, J. A matrix solution for severely broken-down teeth. 1996. *Gen. Dent.* **44**:150-152.
- Koizumi, S., Suzuki, K., Ogra, Y., Yamada, H., Otsuka, F. 1999. Transcriptional activity and regulatory protein binding of metal-responsive elements of the human metallothionein-IIA gene. *Eur. J. Biochem.* **259**:635-42.
- Konijn, A., Glickstein, H., Vaisman, B., Meyron-Holtz, E., Slotki, I., Cabantchik, Z. 1999. The cellular labile iron pool and intracellular ferritin in K562 cells. *Blood.* **94**:2128-2134.
- Kozyraki, R., Fyfe, J., Verroust, P., Jacobsen, C., Dautry-Varsat, A., Gburek, J., Willnow, T., Christensen, E., Moestrup, S. 2001. Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:12491-12496.
- Langmade, S., Ravindra, R., Daniels, P., Andrews. 2000. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J. Biol. Chem.* **275**:34803-34809.
- Lichtlen, P., Wang, Y., Belser, T., Georgiev, O., Cërta, U., Sack, R., Schaffner, W. 2001. Target gene search for the metal-responsive transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res.* **29**:1514-1523.
- Linder, M., Hazegh-Azam M. 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**:797S-811S.
- Linder, M., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R., Lomeli, N., 1998. Copper transport. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**:965S-971S.
- Lyons, T., Gasch, A., Gaither, L., Botstein, D., Brown, P., Eide, D. 2000. Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:7957-7962.
- Matkowskyj, K., Schonfeld, D., Benya, R. 2000. Quantitative Immunohistochemistry by Measuring Cumulative Signal Strength Using Commercially Available Software Photoshop and Matlab. *J. Histochem. Cytochem.* **48**:303-311.
- Matkowskyj, K., Cox, R., Jensen, R., Benya, R. 2003. Quantitative Immunohistochemistry by Measuring Cumulative Signal Strength Accurately Measures Receptor Number. *J. Histochem. Cytochem.* **51**: 205-214.
- McKie, A., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T., Farzaneh, F., Hediger, M., Hentze, M., Simpson, R. 2000. A novel duodenal iron regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell.* **5**:299-309.
- Minc, E., de Coppet, P., Masson, P., Thiery, L., Dutertre, S., Amor-Gueret, M. Jaulin, C. 1999. The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is

regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J. Biol. Chem.* **274**:503-509.

Mobley, W., Neve, R., Prusiner, S., Mckinley, M. 1988. Nerve Growth Factor Increases mRNA Levels for the Prion Protein and the β -amyloid Protein Precursor in Developing Hamster Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:9811-9815.

Mosedale, D., Metcalfe, J., Grainger, D. 1996. Optimization of immunofluorescence methods by quantitative image analysis. *J. Histochem. Cytochem.* **44**:1043-1050.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**:55-63.

Muckenthaler, M., Richter, A., Gunkel, N., Riedel, D., Polycarpou-Schwarz, M., Hentze, S., Falkenhahn, M., Stremmel, W., Ansorge, W., Hentze, M. 2003. Relationships and distinctions in iron-regulatory networks responding to interrelated signals. *Blood.* **101**:3690-3698.

Mueller-Storm, H., Sogo, J., Schaffner W. 1989. An enhancer stimulates transcription in trans when attached to the promoter via protein bridge. *Cell.* **58**:767-777.

Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C., Beyreuther, K. 1996. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper (II) to copper (I). *Science.* **271**:1406-1409.

Murata, M., Gong, P., Suzuki, K., Koizumi, S. 1999. Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes. *J. Cell Physiol.* **180**:105-13.

Murphy, A., Eisinger, W., Shaff, J., Kochian, L., Taiz, L. 1999. Early copper-induced leakage of K (+) from Arabidopsis seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiol.* **121**:1375-82.

Myhre, O., Andersen, J., Aarnes, H., Fonnum, F. 2003. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharm.* **65**:1575-1582.

Naderi, A., Ahmed, A., Barbosa-Morais, N., Aparicio, S., Brenton, J., Caldas, C. 2004. Expression microarray reproducibility is improved by optimising purification steps in RNA amplification and labelling. *BMC Genomics.* **5**:9.

Nakai, A., Satoh, M., Hirayoshi, K., Nagata, K. 1991. Identification of the ATP-binding heat-inducible protein of MR = 37,000 as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**:59-64.

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

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

Nozawa, K., Hori, M., Kitajima, S., Oshiro, S. 1999. Non-iron Metals Bind with Iron Regulatory Protein to Influence Its Function. *J. Health Sci.* **45**:172-176.

Waheed, A., Parkkila, S., Saarnio, J., Fleming, R., Zhou, X., Tomatsu, S., Britton, R., Bacon, B., Sly, W. 1999. Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **96**:1579-1584.

Watanabe, N., Drysdale, J. 1981. Evidence for distinct mRNAs for ferritin subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**:507-511.

White, A., Reyes, R., Mercer, J., Camakaris, J., Zheng, H., Bush, A., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C., Cappai, R. 1999. Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice. *Brain Res.* **842**:439-444.

Yan, Y., Bai, Y., Wang, L., Miao, S., Koide, S. 1990. Characterization of cDNA encoding a human sperm membrane protein related to A4 amyloid protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **87**: 2405-2408.

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

Yang, F., Lum, J., John R., McGill, Ch., Moore, M., Naylor, S. 1984. Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:2752-2756.

Yang, F., Wang, X., Haile, D., Piantadosi, C., Ghio, A., 2002. Iron increases expression of ironexport protein MTP1 in lung cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **283**: L932-L939.

Yip, R., Johnson, C., Dallman, P. 1984. Age-related changes in laboratory values used in the diagnosis of anemia and iron deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* **39**:427-436.

Yoo, H., Chang, M., Rho, H. 1999. Induction of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid. *Gene.* **234**:87-91.

Yoshida, T., Biro, P., Cohen, T., Muller, R., Shibahara, S. 1988. Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by human. *Europ. J. Biochem.* **171**:457-461.

Yun, C., Ferea, T., Rashford, J., Ardon, O., Brown, P., Botstein, D., Kaplan, J., Philpott, C. 2000. Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for two pathways of iron uptake. *J. Biol. Chem.* **275**:10709-10715.

Zhang, B., Georgiev, O., Hagmann, M., Günes Ç., 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**:8471-8485.

Zhou, B., Gitschier, J. 1997. hCTR1: A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:7481-7486.

Zhumabayeva, B., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P. 2001. Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors. *Biotechniques.* **30**:158-63.

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**:213-218.

Palmiter, R. 1994. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:1219-1223.

Palmiter, R. 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 8428-9430.

Petruzzella, V., Tiranti, V., Fernandez, P., Ianna, P., Carrozzo, R., Zeviani, M. 1998. Identification and characterization of human cDNAs specific to BCS1, PET112, SCO1, COX15, and COX11, five genes involved in the formation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Genomics.* **54**:494-504.

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**:805-808.

Richards, M. 1989. Recent developments in trace element metabolism and function: role of metallothionein in copper and zinc metabolism. *J. Nutr.* **119**:1062-1670.

Rosen, D., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J., Deng, H., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S., Berger, R., Tanzi, R., Halperin, J., Herzfeldt, B., Van den Bergh, R., Hung, W., Bird, T., Deng, G., Mulder, D., Smyth, C., Laing, N., Soriano, E., Pericak-Vance, M., Haines, J., Rouleau, G., Gusella, J., Horvitz, H., Brown, R., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* **362**:59-62.

Roughead, Z., Johnson, L., Hunt, J. 1999. Dietary copper primarily affects antioxidant capacity and dietary iron mainly affects iron status in a surface response study of female rats fed varying concentrations of iron, zinc and copper. *J. Nutr.* **129**:1368-1376.

Samson, S., Paramchuk, W., Shworak, N., Gedamu, L. Functional analyses of the human metallothionein-IG gene. 1995. *In vitro* and *in vivo* studies. *J. Biol. Chem.* **270**:25194-25199.

Savary, S., Allikmets, R., Denizot, F., Luciani, M.-F., Mattei, M.-G., Dean, M., Chimini, G. 1997. Isolation and chromosomal mapping of a novel ATP-binding cassette transporter conserved in mouse and human. *Genomics.* **41**:275-278.

Seth, D., Gorrell, M., McGuinness, P., Leo, M., Lieber, C., McCaughan, G., Haber, P. 2003. SMART amplification maintains representation of relative gene expression: quantitative validation by real time PCR and application to studies of alcoholic liver disease in primates. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **55**:53-66.

Shimada, Y., Okuno, S., Kawai, A., Shinomiya, H., Saito, A., Suzuki, M., Omori, Y., Nishino, N., Kanemoto, N., Fujiwara, T., Horie, M., Takahashi, E. 1998. Cloning and chromosomal mapping of a novel ABC transporter gene (hABC7), a candidate for X-linked sideroblastic anemia with spinocerebellar ataxia. *J. Hum. Genet.* **43**:115-122.

Shoichet, S., Baumer, A., Stamenkovic, D., Sauer, H., Pfeiffer, A., Kahn, C., Muller-Wieland, D., Richter, C., Ristow, M. 2002. Frataxin promotes antioxidant defense in a

thiol-dependent manner resulting in diminished malignant transformation *in vitro*. *Hum. Molec. Genet.* **11**: 815-821.

Simons, A., Ruppert, T., Schmidt, C., Schlicksupp, A., Pipkorn, R., Reed, J., Masters, C., Whiter, A., Cappai, R., Beyreuther, K., Bayer, T., Multhaup, G. 2002. Evidence for a copper-binding superfamily of the amyloid precursor protein. *Biochemistry.* **41**:9310-9320.

Song, M., Freedman J. 2005. Expression of copper-responsive genes in HepG2 cells. *Mol. Cell Biochem.* **279**:141-147.

Takahashi, M., Dore, S., Ferris, C., Tomita, T., Sawa, A., Wolosker, H., Borchelt, D. R., Iwatsubo, T., Kim, S., Thinakaran, G., Sisodia, S., Snyder, S. 2000. Amyloid precursor proteins inhibit heme oxygenase activity and augment neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Neuron.* **28**:461-473.

Tapia, L., Suazo, M., Hodar, C., Cambiazo, V., González, M. 2003. Copper exposure modifies the content and distribution of trace metals in mammalian cultured cells. *Biometals.* **16**:169-74.

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**:617-624.

Tapiero, H., Townsend, M., Tew, K. 2001. Trace elements in human physiology and pathology: Copper. *Biomed. Pharmacother.* **57**:386-398.

Tennant, J., Stansøelda, M., Yamajib, S., Sraib, S., Sharpa, P. 2002. Effects of copper on the expression of metal transporters in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters.* **527**:239-244.

Thiele, D. Metal-regulated transcription in eukaryotes. 1992. *Nucleic Acids Res.* **20**:1183-91.

Thiele, D., Walling, M., Hamer, D. 1986. Mammalian metallothionein is functional in yeast. *Science.* **231**:854-856.

Turnlund, J., Keyes, W., Anderson, H., Acord, L. 1989. Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper using the stable isotope ⁶⁵Cu. *Am. J. Clin. Nutr.* **49**:870-878.

Uauy, R., Olivares, M., González, M. 1998. Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**:952S-959S.

Vanik, D., Surewicz, W. 2002. Disease-associated F198S mutation increases the propensity of the recombinant prion protein for conformational conversion to scrapie-like form. *J. Biol. Chem.* **277**:49065-49070.

Vulpe, C., Packman, S. 1995. Cellular copper transport. *Annu. Rev. Nutr.* **15**:293-322.

Vulpe, C., Kuo, Y., Murphy, T., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., Anderson, G. 1999. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nature Genet.* **21**:195-199.