



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular, Fisiología e inmunología**

**REGULACIÓN DE LAS METALOTIONEÍNAS DURANTE
EL ESTRÉS Y LA INFLAMACIÓN, Y SU INFLUENCIA
DURANTE LA RESPUESTA INFLAMATORIA**

Javier Carrasco Trancoso
Bellaterra, 2000

Memoria de la tesis presentada por **Javier Carrasco Trancoso** para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del **Doctor Juan Hidalgo Pareja**, profesor titular del departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Director de tesis

Doctorando

Dr. Juan Hidalgo Pareja

Javier Carrasco Trancoso

ÍNDICE

Introducción	1
1. Características generales	3
1.1. Metalotioneínas de mamífero	3
1.1.1. Tioneína	4
1.1.2. Contenido metálico	4
1.1.3. Estructura	5
2. Distribución de las metalotioneínas	7
3. Regulación de las metalotioneínas	9
3.1. Genes de las metalotioneínas	9
3.2. Mecanismos de regulación de las metalotioneínas	10
3.2.1. Mecanismos pretranscripcionales	10
3.2.2. Control transcripcional	11
3.2.3. Control postranscripcional	13
3.3. Inductores	13
3.3.1. Metales	15
3.3.2. Hormonas	15
3.3.3. Citoquinas	18
<i>Interleuquina-1</i>	19
<i>Interleuquina-6</i>	20
<i>Factor de necrosis tumoral</i>	21
<i>Interferón</i>	22
3.3.4. Estrés	23
<i>Estrés por inmovilización</i>	25
3.3.5. Respuesta inflamatoria	26
<i>Inflamación aguda</i>	27
<i>Inflamación crónica</i>	29
3.3.6. Estrés oxidativo	31
4. Funciones de las metalotioneínas	33
4.1. Funciones relacionadas con los metales	33
4.1.1. Detoxificadoras	33
4.1.2. Homeostasis	35
4.1.3. Reservorio/donadoras	36
4.2. Antioxidantes	37
4.3. Efectos sobre proliferación, crecimiento y activación celular. Implicaciones sobre el sistema inmunitario	39
4.4. Funciones de las metalotioneínas cerebrales	41
4.4.1. Metalotioneína-III	44
Objetivos	47
Resultados	51
Trabajo 1	53
Regulation of the synthesis of brain metallothioneins <i>Neurotoxicology 19: 661-666, 1998</i>	
Trabajo 2	61
Metallothionein (MT)-III: generation of polyclonal antibodies, comparison with MT-I+II in the freeze lesioned rat brain and in a bioassay with astrocytes, and analysis of Alzheimer's disease brains <i>Journal of neurotrauma 16: 1115-29, 1999</i>	
Trabajo 3	79
Localization of metallothionein-I and -III expression in the CNS of transgenic mice astrocyte-targeted expression of interleukin-6 <i>Experimental neurology 153: 184-194, 1998</i>	
Trabajo 4	93
Metallothioneins are upregulated in symptomatic mice with astrocyte-targeted expression of tumor necrosis factor- α <i>Experimental neurology 163: 46-54, 2000</i>	

Trabajo 5	105
Interleukin-6 and tumor necrosis factor- α type 1 receptor deficient mice reveal a role of IL-6 and TNF- α on brain metallothionein-I and -III regulation <i>Molecular Brain Research</i> 57: 221-243, 1998	
Trabajo 6	121
Effect of dietary zinc deficiency on brain metallothionein-I and -III mRNA levels during stress and inflammation <i>Neurochemistry International</i> 36: 555-562, 2000	
Trabajo 7	131
Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression <i>Biochemical Journal</i> 337: 59-65, 1999	
Trabajo 8	141
Metallothionein induction by restraint stress: role of glucocorticoids and IL-6 <i>Cytokine</i> ,12: 791-796, 2000	
Trabajo 9	149
Role of interleukin-6 on metallothioneins response to brain injury <i>Manuscrito</i>	
Trabajo 10	157
Metallothionein (MT)-I and -III response to cryo injury and the effect of MT-I+II genetic deficiency on MT-III <i>Manuscrito</i>	
Trabajo 11	165
The zinc or copper deficiency-induced impaired inflammatory response to brain trauma may be caused by the concomitant metallothionein changes <i>Journal of Neurotrauma</i> , en prensa, 2000	
Trabajo 12	183
Enhanced seizures and hippocampal neurodegeneration following kainic acid induced seizures in metallothionein-I+II deficient mice <i>European Journal of Neuroscience</i> , 12: 2311-2322, 2000	
Discusión	201
1. Regulación de las metalotioneínas durante el estrés y la inflamación	203
1.1. Efecto de la IL-6 sobre las metalotioneínas hepáticas y cerebrales	204
1.2. Efecto del TNF- α sobre las metalotioneínas cerebrales durante el estrés y la inflamación.....	208
2. Metalotioneínas y lesiones cerebrales	209
2.1. Regulación de las metalotioneínas durante lesiones cerebrales.....	210
2.2. Funciones de las metalotioneínas en situación de lesión del SNC.....	212
2.2.1. Metalotioneínas-I y -II	212
2.2.2. Metalotioneína-III	216
Conclusiones generales	219
Referencias	223

ABREVIACIONES

AD: Enfermedad de Alzheimer
ADX: adrenalectomía
Ag: Plata
ALS: Esclerosis lateral amiotrófica
6-AN: 6-aminonicotinamida
ARE: Elemento de respuesta antioxidante
Bi: Bismuto
Cd: Cadmio
Co: Cobalto
Cu: Cobre
GFAP: proteína ácida fibrilar glial
GRE: Elemento de respuesta a glucocorticoides
Hg: Mercurio
HPA: Eje hipotalámico-pituitario-adrenal
i.c.v : intracerebroventricular
IFN: Interferón
IL: Interleuquina
IL6-KO: *Knockout* para la IL-6
i.p: intraperitoneal
KA: Acido kaínico
KO: *Knockout*
LCR: región controladora de locus
LPS: Lipopolisacárido bacteriano (Endotoxina)
M+P : Médula y puente
MRE: Elemento de respuesta a metales
MT: Metalotioneína
MTi: inhibidor del MTF
MTF: Factor de transcripción de respuesta a metales
MT-KO: *Knockout* para las MT-I+II
Ni: Níquel
Pb: Plomo
ROS: Especie reactiva de oxígeno
S.I: Sistema inmunitario
SNC: Sistema nervioso central
STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción
USF: factor estimulador *upstream*
tBHQ: *tert*-butilhidroquinona
TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α
TNFR1-KO: *Knockout* para el receptor tipo 1 del TNF- α
Zn: Zinc

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Características generales

Estudiando los constituyentes tisulares responsables de la acumulación de Cadmio (Cd) se aisló en 1957 la metalotioneína (MT) renal equina (Margoshes and Vallee, 1957). Su posterior caracterización puso de manifiesto que se trataba de un polipéptido de bajo peso molecular, con un alto contenido en cisteínas y sin aminoácidos aromáticos ni histidina. Estas proteínas contienen varios átomos metálicos en su molécula que se encuentran coordinados en dos estructuras en forma de *cluster* metal-tiolato (Kägi and Vallee, 1960). Desde entonces hasta nuestros días se han descubierto otras proteínas y péptidos no proteinógenos, a lo largo de toda la escala filogenética, que se asimilan a la MT renal equina en varias de las características mencionadas más arriba. Este conjunto de polipéptidos constituye la superfamilia de las metalotioneínas. A pesar que existen notables diferencias entre ellas, todas estas moléculas presentan una serie de características comunes que se mantienen a lo largo de la evolución. Debido a la amplitud del grupo se ha establecido una clasificación, basándose en homologías de secuencias y criterios filogenéticos que ha subdividido la superfamilia en varias familias, subfamilias, y otras categorías inferiores (Binz and Kägi, 1999; Kojima *et al.*, 1999).

1.1 MTs de mamífero

Se han establecido 15 familias de MTs, la primera de las cuales corresponde a las proteínas aisladas de vertebrados (para más información sobre el resto de familias y la clasificación visitar <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>). Las MTs de esta familia, al igual que todas las demás, presentan dos componentes claramente diferenciados en cuanto a su naturaleza química. Poseen un componente polipeptídico y otro metálico. Frecuentemente se utiliza el término tioneína en referencia a la proteína en ausencia de metales.

La familia 1 presenta varias subfamilias de las cuales cuatro pertenecen a las MTs de mamíferos: mMT-I, mMT-II, mMT-III y mMT-IV. En algunas especies, como la nuestra, se han aislado varios miembros de una misma subfamilia, en concreto de la mMT-I. En otras, como en el ratón (animal con el cual se desarrollan la mayoría de estudios de este trabajo), sólo se conoce la existencia de una isoforma representante de cada una de las subfamilias, denominadas MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV respectivamente. Las MT-I y MT-II están bien caracterizadas desde el punto de vista bioquímico y han sido ampliamente estudiadas desde su descubrimiento en 1957, aunque no fueron aisladas en el ratón hasta 1975 (Nordberg *et al.*, 1975). En 1991 se aisló a partir de extractos cerebrales humanos (Uchida *et al.*, 1991) el primer miembro de mMT-III y enseguida se comprobó la existencia de un homólogo murino en 1992 (Palmiter *et al.*, 1992). Dos años más tarde se clonó a partir de epitelio estratificado de la lengua de ratón el gen de la primera proteína del tipo mMT-IV (Quaife *et al.*, 1994).

1.1.1 Tioneína

Tioneína es el nombre que recibe la MT sin metales. Como en todas las proteínas, sus propiedades vienen determinadas, en gran medida, por su secuencia de aminoácidos, que en este caso está compuesta de entre 61 y 68 unidades. El rasgo más destacable de la secuencia aminoacídica de las MTs de mamífero es la gran proporción de cisteínas (Cys), en concreto 20 por molécula. Estas cisteínas se agrupan en secuencias del tipo Cys-X-Cys, Cys-Cys y Cys-X-Y-Cys, donde X e Y son aminoácidos diferentes de la cisteína. Las cisteínas de las MTs de ratón se encuentran conservadas tanto entre ellas como entre proteínas de diferentes especies. También es considerable la conservación, aunque en menor medida, de las argininas (Arg) y lisinas (Lys). Por el contrario el resto de residuos es mucho más variable entre las diferentes secuencias (Kagi, 1993)(figura 1). Los aminoácidos conservados (Cys, Arg, Lys) son los responsables de la unión a metales, especialmente las cisteínas (Chernaik and Huang, 1991; Cismowski and Huang, 1991; Cismowski *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1998), aunque las lisinas y argininas también podrían intervenir (Cody and Huang, 1994; Pan *et al.*, 1994).

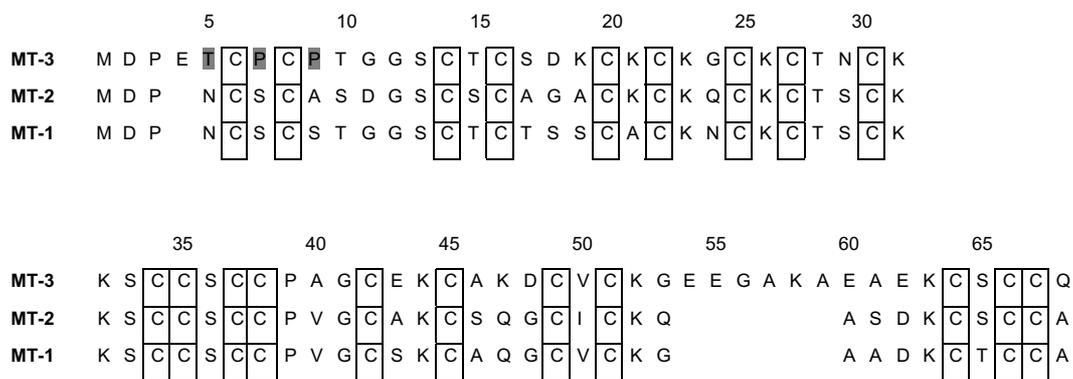


Figura 1. Se muestran las secuencias alineadas de las isoformas MT-I –II y -III, de ratón. Las secuencias están divididas en dos paneles de forma que el superior corresponde al dominio beta y el inferior al dominio alfa. Las cisteínas conservadas están encuadradas mientras que en sombreado se representan varios de los aminoácidos que pueden representar un cambio significativo para la estructura de la MT-III.

Las proteínas de la subfamilia mMT-III presentan características en su secuencia que las diferencian del resto. En primer lugar tienen dos inserciones: una treonina en posición 5 y un hexapéptido en posición 55. Por otra parte en el extremo N-terminal presentan dos prolinas intercaladas entre dos cisteínas, formando la secuencia C-P-C-P, que no existe en los miembros de las otras subfamilias. La aparición de esta nueva secuencia podría tener gran importancia en su estructura y por lo tanto en su función (Sewell *et al.*, 1995; Uchida and Ihara, 1995) (figura 1).

1.1.2 Contenido metálico

El espectro de metales que pueden unirse a las MTs es bastante amplio. La afinidad con que los unen varía dependiendo del elemento metálico. En condiciones fisiológicas las MTs suelen coordinar Zinc (Zn) y/o Cobre (Cu). No obstante si existe una elevada concentración de

otros metales pesados en el medio, como el Cd o Mercurio (Hg), estos pueden desplazar a los anteriores. Podemos establecer una escala de afinidades entre las MTs y los metales. El Cu y el Hg figuran entre los metales con mayor afinidad por las MTs, mientras que el Zn se encuentra en el otro extremo de la escala. De manera resumida: Zn (II) < Plomo (Pb) (II) < Cd (II) < Cu (I), Plata (Ag) (I), Hg (II), Bismuto (Bi) (II) (Kägi and Kojima, 1987).

El contenido metálico puede variar según el tejido, la situación fisiológica y las condiciones ambientales. Es frecuente que las MT-I y MT-II contengan 7 equivalentes de metal divalente (Nielson *et al.*, 1985). No obstante son capaces de unir un número superior de metales monovalentes (Bofill *et al.*, 1999) y bajo ciertas circunstancias se puede incrementar el contenido de metales divalentes (Capdevila *et al.*, 1997; Cols *et al.*, 1997). La unión a los metales es reversible de manera que bajo determinadas condiciones, como un descenso del pH o variaciones en el estado redox, se pueden desplazar los átomos metálicos de la molécula de MT obteniendo así la apoproteína. Normalmente las MT-I y -II, al ser aisladas de tejidos biológicos contienen 7 átomos de Zn por molécula, aunque también pueden poseer ciertas cantidades de Cu. Las MT-III aisladas de cerebro bovino y equino (Pountney *et al.*, 1994) han demostrado contener 4 átomos de Cu y 3 de Zn por molécula a diferencia de las MT-I y -II cerebrales que sólo contienen Zn (Paliwal and Ebadi, 1989). De todas maneras, al menos *in vitro*, las MT-III bovina y equina, al igual que las MT-I y -II pueden ligar otros metales, como el Cd, y se mantiene la relación estequiométrica entre átomos metálicos y moléculas de MT (Pountney *et al.*, 1994).

1.1.3 Estructura

Como cualquier proteína, la estructura está condicionada por su secuencia de aminoácidos. Sobre ésta puede influir la unión con cofactores. En el caso de las MTs, los metales pueden jugar un papel muy importante en la adquisición de la estructura terciaria correcta.

El elemento clave para la unión de estos metales son las cisteínas que en situación fisiológica se encuentran reducidas y se coordinan con los átomos metálicos. Mediante diversas técnicas espectrofotométricas se ha podido determinar en las MT-I y MT-II la naturaleza de los enlaces con los metales y su estructura espacial (Vallee, 1987; Vallee and Maret, 1993)(Kagī, 1993). Se ha apreciado la presencia de dos *clusters* diferenciados en los cuales cada átomo metálico divalente está coordinado con cuatro cisteínas. El *cluster* más cercano al extremo N-terminal es capaz de coordinar 3 átomos metálicos mientras que el más cercano al C-terminal une 4 átomos. Cada uno de estos *cluster* se encuentra localizado en un dominio globular denominados dominio β y α respectivamente. Cada dominio está totalmente separado del otro y se unen entre sí por un *loop* flexible (Winge and Miklossy, 1982). Esta independencia se manifiesta también en su formación y en la dinámica de los metales. Así, el primer dominio en formarse es el α que a su vez posee mayor resistencia a ceder los átomos metálicos que el β (Nielson and Winge, 1983; Nielson and Winge, 1984; Stillman *et al.*, 1987). Así pues, las MTs están formadas por dos dominios prácticamente idénticos con un centro

metálico alrededor del cual se estructura la cadena polipeptídica en forma de giros helicoidales hacia la derecha en el caso del dominio β y hacia la izquierda en el caso del α (Schultze *et al.*, 1988; Kägi, 1993).

Las moléculas de MT-I y -II poseen cierta plasticidad estérica debido a la presencia del *loop* que une los dos dominios. Además, debido a que las MTs son capaces de aceptar átomos de diferentes tamaños es necesario que la estructura tenga cierta flexibilidad. Esta facultad se consigue gracias a que no poseen un alto grado de estructuración debido a la carencia de estructuras secundarias rígidas (Messerle *et al.*, 1990; Messerle *et al.*, 1992). Adicionalmente a la variabilidad estérica, las MT-I y -II son moléculas dinámicas puesto que pueden intercambiar su contenido metálico con el medio, con otros ligandos o con otras MTs (Nettesheim *et al.*, 1985). Es decir son proteínas que pueden variar su contenido metálico y en cierto grado su estructura. Este hecho podría ser de especial relevancia para desarrollar sus funciones ya que es posible que el contenido metálico influya sobre sus funciones y/o sobre los factores que puedan interactuar con ellas.

Las otras MTs han sido menos estudiadas debido a su reciente descubrimiento y no se poseen datos tan exactos acerca de su conformación. La MT-III, presenta una disposición de las cisteínas prácticamente idéntica a la de las MT-I y MT-II; por tanto podríamos pensar que sus características tanto de unión de metales como estructurales son similares. Una característica peculiar estriba en la existencia de estructuras intercambiables en el *cluster* del dominio β de las MT-III bovinas y equinas (Faller *et al.*, 1999), es decir existe más de una conformación posible. Debido a esto podrían variar su topología de superficie, sumándose esta variabilidad estructural a la ya descrita para la MT-I y MT-II. Por otra parte la inserción en la posición 5 y la aparición de las dos prolinas generando la secuencia C-P-C-P puede producir importantes variaciones estructurales respecto a las isoformas I y II, aunque no se han identificado específicamente. Se ha observado en otras proteínas que las secuencias tipo (X-P)_n causan la aparición de un tipo especial de giros: los *elbow-hinged*. Por tanto es posible que en la MT-III aparezcan giros adicionales que produzcan una estructura local más compacta (Sewell *et al.*, 1995; Uchida and Ihara, 1995). En conjunto estos cambios estructurales respecto a las MT-I y MT-II podrían ser de gran relevancia para la interpretación de las diferencias funcionales observadas entre la MT-III y las demás isoformas, que se comentarán más adelante.

2. Distribución de las MTs

Las MT-I y MT-II se expresan de manera coordinada (Yagle and Palmiter, 1985) y lo hacen en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente importante su presencia en órganos parenquimatosos como el hígado, riñón, intestino, testículos, pulmón, corazón y cerebro (Zelazowski and Piotrowski, 1977; Onosaka *et al.*, 1984). Además debemos añadir la presencia de estas proteínas en el suero, aunque el mecanismo por el cual son secretadas no es el tradicional puesto que no poseen péptido señal. Por el contrario la MT-III y la MT-IV tienen una distribución bastante más restringida, expresándose fundamentalmente en el sistema nervioso central (SNC) (Uchida *et al.*, 1991; Palmiter *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1993) y epitelio escamoso estratificado (Quaife *et al.*, 1994) respectivamente. No obstante se han detectado en otros tejidos, aunque en cantidades significativamente menores, como en la decidua materna (Liang *et al.*, 1996), y específicamente la MT-III en los tractos reproductores masculino y femenino, lengua, estómago, corazón y riñón (Moffat *et al.*, 1999).

Aunque las MT-I y MT-II se encuentran en prácticamente todos los tejidos no se expresan en todas las células. Así por ejemplo, en el hígado se expresan en los hepatocitos pero no en las células de Kupffer y en el riñón se encuentran principalmente en el túbulo proximal de la nefrona (Okabe *et al.*, 1996).

En el SNC, principal órgano de estudio de este trabajo, el panorama es más complicado. El estudio de la distribución de las MTs cerebrales se ha realizado fundamentalmente con técnicas inmunocitoquímicas, estableciéndose con precisión la localización de las MT-I y -II del SNC de primates y roedores. Estas proteínas no se expresan en todas las células ni lo hacen por igual en todas las áreas del encéfalo. A pesar de la existencia de cierta variedad dependiendo del anticuerpo utilizado, la conclusión general es que, en condiciones normales, las MT-I y II se expresan en células ependimales, plexo coroideo, aracnoides, piamadre y en astrocitos (Swanson *et al.*, 1985; Nakajima *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1991; Nishimura *et al.*, 1992; Blaauwgeers *et al.*, 1993; Blaauwgeers *et al.*, 1994). Los astrocitos que expresan MT-I y -II se encuentran dispersos por todo el SNC y son más abundantes en la materia gris, siendo probablemente protoplasmáticos (Blaauwgeers *et al.*, 1993). Es destacable la expresión de las MT-I y -II en astrocitos de la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo. Por el contrario las neuronas, oligodendrocitos y microglia no expresan MT-I y -II en condición basal (Young *et al.*, 1991; Nishimura *et al.*, 1992; Blaauwgeers *et al.*, 1994). No obstante, en otros estudios se ha detectado MT-I+II en neuronas (Hidalgo *et al.*, 1994a; Leyshon *et al.*, 1994) y en microglia en circunstancias de lesión cerebral (Vela *et al.*, 1997; Acarin *et al.*, 1999b).

El análisis de la expresión del mRNA de MT-I y -II confirma el patrón de expresión anterior. Se ha comprobado tanto por Northern (Belloso *et al.*, 1996) como por hibridación *in situ* (Itano *et al.*, 1991; Hao *et al.*, 1994; Masters *et al.*, 1994b; Choudhuri *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1995a) que se expresan principalmente en astrocitos aunque también en neuronas. El

mRNA de estas proteínas se encuentra prácticamente en todas las áreas cerebrales aunque entre ellas destacan la capa de Purkinje de la corteza cerebelar.

Finalmente, en cultivo primario de células cerebrales de rata se ha confirmado que las MT-I y -II se expresan principalmente en células gliales. No obstante también se detecta presencia de estas proteínas en cultivos primarios de neuronas, aunque en cantidades inferiores a las calculadas para la glia (Hidalgo *et al.*, 1994a; Kramer *et al.*, 1996b).

Respecto a la MT-III no existe un consenso en cuanto a su localización. Algunos investigadores han detectado inmunoreactividad exclusivamente en astrocitos (Uchida *et al.*, 1991; Uchida, 1993; Uchida, 1994; Inuzuka *et al.*, 1996), otros han podido observar expresión tanto en astrocitos como neuronas, aunque en menor medida en el último caso, (Yamada *et al.*, 1996) y recientemente otros autores la han localizado principalmente en neuronas (Yanagitani *et al.*, 1999). Al igual que ocurre con la proteína, los estudios sobre la expresión del mRNA para la MT-III son contradictorios. Así tenemos de nuevo las tres posibilidades: esencialmente en astrocitos (Uchida, 1993), tanto en neuronas como células gliales (Anezaki *et al.*, 1995; Hozumi *et al.*, 1995; Hozumi *et al.*, 1998) o principalmente neuronas, especialmente aquellas que contienen Zn vesicular (Masters *et al.*, 1994b; Choudhuri *et al.*, 1995; Yuguchi *et al.*, 1995a; Yuguchi *et al.*, 1995b; Yuguchi *et al.*, 1997). Estudios con animales transgénicos en los cuales se ha puesto bajo control del promotor de la MT-III el gen de la β -galactosidasa han demostrado la presencia del producto transgénico en neuronas (Masters *et al.*, 1994b). En conjunto estos resultados hacen pensar que la MT-III es una proteína esencialmente neuronal, aunque no puede descartarse que localmente o bajo ciertos estímulos se exprese en células gliales.

En cuanto a la localización subcelular las MT-I y -II son proteínas esencialmente citoplasmáticas (Cherian *et al.*, 1981) aunque también se ha detectado su presencia en fracciones mitocondriales y lisosomales (Riordan and Richards, 1980; Sato and Nagai, 1980), así como en núcleos celulares (Banerjee *et al.*, 1982; Vela *et al.*, 1997). La MT-III se ha observado mediante microscopía electrónica asociada a ribosomas libres y a la parte citosólica del retículo endoplasmático, pequeñas vesículas y la membrana exterior de las mitocondrias; también se ha detectado, aunque en menor medida, en asociación con la membrana plasmática en procesos celulares tanto de astrocitos como de neuronas (Yamada *et al.*, 1996).

3. Regulación de las MTs

No debemos confundir la ubicuidad de la MT-I y MT-II con uniformidad puesto que su nivel de expresión e incluso localización intracelular varía según el tejido y estado del desarrollo pre- y postnatal así como durante alteraciones de la homeóstasis. Además son proteínas altamente inducibles por gran variedad de tratamientos experimentales. No todos los tejidos responden igual ante un mismo estímulo, siendo quizás el hígado el órgano con mayor capacidad de respuesta desde el punto de vista de las MTs. Por tanto, generalmente se ha usado este órgano en el estudio de la regulación de las MTs. Por el contrario el cerebro estaría en el polo opuesto.

La concentración final de una proteína puede ser regulada de muchas maneras. El primer mecanismo de control es la regulación de la expresión del gen que codifica para una determinada proteína. Esto se puede llevar a cabo mediante modificaciones locales de la cromatina o actuando a través del promotor del gen. Ambos mecanismos están influidos por la localización del gen en el genoma y por la estructura del promotor. Por tanto un primer paso para comprender la regulación de las MTs es conocer sus genes.

3.1 Genes de las MTs

En el caso de las MTs, existen genes funcionales que normalmente se encuentran agrupados en un mismo cromosoma y en algunas especies también encontramos genes no funcionales dispersos por el genoma. Estos últimos pueden ser de dos tipos diferentes: i) aquellos que tienen estructura de intrones y exones pero que debido a la presencia de mutaciones no pueden producir ningún tipo de proteínas y ii) pseudogenes sin estructura de intrones y exones que probablemente provienen de mensajeros procesados que han sufrido transcripción reversa y posteriormente el producto se ha insertado en el genoma (Karin and Richards, 1982; Palmiter, 1987).

En el ratón todos los genes de las MTs son funcionales y se encuentran ligados en un *locus* del cromosoma 8 (Cox and Palmiter, 1983). Este *locus* ocupa aproximadamente 50 Kb y todos los genes contenidos en él se transcriben en el mismo sentido. El primero en ser clonado fue el de la MT-I (Durnam *et al.*, 1980) seguido de la MT-II (Searle *et al.*, 1984). Los genes de la MT-III y MT-IV fueron clonados con posterioridad debido a que en aquellos momentos aún no se había aislado ninguna de las proteínas que codifican y a una mayor separación génica por lo que los procesos de rastreo fueron infructuosos. No fue hasta 1992 cuando se clonó el gen de la MT-III (Palmiter *et al.*, 1992) y seguidamente el de la MT-IV (Quaife *et al.*, 1994). Cabe destacar en este *locus*, además de los cuatro genes, la presencia de dos regiones hipersensibles a la acción de la DNasa I que se sitúan flanqueando los genes de la MT-I y MT-II (Palmiter *et al.*, 1993a; Palmiter *et al.*, 1993b). Estas regiones como veremos más adelante pueden tener gran importancia en la regulación de la expresión de las MTs (figura 2).

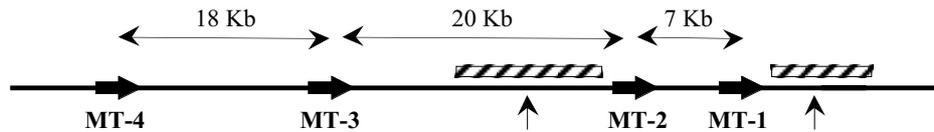


Figura 2. Representación esquemática del *locus* de ratón en el que se encuentran situados los genes de las MTs. Mediante flechas horizontales se indica la posición y orientación de los genes. Las flechas verticales apuntan la posición de las zonas hipersensibles al tratamiento con DNasa I. Los rectángulos rayados señalan la localización de las teóricas regiones de control del *locus* (LCR). Adaptado de (Palmiter *et al.*, 1993b).

Los cuatro genes de ratón están compuestos de tres exones separados por dos intrones de aproximadamente 1 o 2 Kb cada uno. La posición de los intrones respecto a los codones que codifican para las cisteínas se encuentra perfectamente conservada entre los diferentes genes. Así, para la MT-I y MT-II el primer intrón se sitúa después del codón para el aminoácido 10 y el segundo después del codón para el aminoácido 32 (Palmiter *et al.*, 1993b).

Existe una gran homología entre las regiones codificantes aunque no se extiende a los intrones y las regiones 5' y 3' no traducidas del gen, así como tampoco a las zonas no transcritas (Palmiter *et al.*, 1993b). Estas diferencias sugieren que la divergencia evolutiva de los diferentes genes es muy antigua y que posiblemente se remonta a periodos previos a la formación de los diferentes órdenes de los mamíferos (Binz and Kägi, 1999). La estructura en detalle de la región promotora de los genes de las MTs la comentaré junto con los mecanismos de regulación transcripcionales.

3.2 Mecanismos de regulación

3.2.1 Mecanismos pretranscripcionales

Tal como he expuesto existen sustanciales diferencias en cuanto a la expresión de las varias isoformas. No obstante, las MT-I y MT-II tienen un patrón de expresión muy similar y parecen responder de manera coordinada a diferentes estímulos (Searle *et al.*, 1984; Yagle and Palmiter, 1985). Debido a esto, Palmiter y colaboradores proponen que a pesar de situarse todos los genes en el mismo *locus*, los correspondientes a las dos isoformas ubicuas estarían en un dominio de cromatina independiente. Este dominio podría estar estructurado de manera diferente a los adyacentes condicionando así la expresión de los genes contenidos en él o sufrir cualquier tipo de regulación a gran escala de manera independiente al resto de genes del *locus*. Esto podría conseguirse gracias a la presencia de *locus control regions* (LCR), es decir regiones que controlan la actividad transcripcional de un segmento de DNA que pueden contener varios genes. Flanqueando los genes de la MT-I y MT-II se han descrito regiones hipersensibles a la DNasa I, que generalmente se consideran indicativas de la presencia de LCR (MacArthur and Lieberman, 1987)(ver figura 2). En algunos experimentos se ha comprobado que estas zonas podrían comportarse como LCR (Palmiter *et al.*, 1993a; Iszard *et al.*, 1995a). Además, se ha especulado que los LCR del *locus* de las MTs podrían controlar la

metilación del DNA en esta zona durante el desarrollo, mecanismo que se sabe inactiva la expresión de las MTs (Compere and Palmiter, 1981; Lieberman *et al.*, 1983; MacArthur and Lieberman, 1987), y por tanto contribuir al patrón específico de expresión de estas proteínas.

La amplificación génica, es decir la aparición de un número adicional de copias de un gen, puede incrementar la presencia de proteína sin afectar a la tasa de transcripción de cada gen individual. Este fenómeno se ha observado para los genes de las MT-I y -II en cultivo de células de ratón (Mayo and Palmiter, 1982) y de hámster (Crawford *et al.*, 1985) bajo presión selectiva por dosis subletales de Cd. No obstante, no se conoce si este mecanismo se produce *in vivo* y en condiciones fisiológicas.

3.2.2 Control transcripcional

El siguiente nivel es el transcripcional, en el que se controla la tasa de producción del RNA mensajero. Parece ser que en el caso de las MTs de mamífero este es el principal mecanismo de regulación puesto que se ha observado que la acumulación de la proteína es proporcional a la inducción del mRNA (Durnam and Palmiter, 1981a; Mayo and Palmiter, 1981).

La base molecular de este sistema de regulación estriba en la existencia de determinadas secuencias de DNA, generalmente en la zona 5' no transcrita del gen (promotor), denominados elementos de respuesta o elementos *cis* a los que se pueden unir diferentes proteínas denominadas elementos *trans* o factores de transcripción. La interacción de estos dos elementos y entre las diferentes parejas posibles dentro de un promotor modula la expresión del gen. Algunos de estos elementos son esenciales para la transcripción basal, como la caja TATA, mientras que otros permiten un incremento de la tasa de transcripción en respuesta a estímulos internos o externos.

En los promotores de los genes de MT de ratón, encontramos elementos *cis* tanto en la zona cercana al inicio de transcripción como en puntos más alejados. A pesar de las diferencias existentes entre las zonas 5' no transcritas de estos genes, todos tienen en común la presencia de determinadas secuencias capaces de actuar como elementos de respuesta. No obstante su posición y número no está conservado entre los distintos promotores. Además existen algunas secuencias *cis* específicas de determinados promotores. En la figura 3 se puede observar una representación de las zonas promotoras de los genes codificantes para MT-I y MT-III de ratón.

Entre los elementos de respuesta hay que destacar los *metal responsive elements* (MRE) (Searle *et al.*, 1984; Palmiter, 1987) que se encuentran en todos los genes de MTs de ratón. Existen varias copias que se sitúan entre 0 y -200 pb. Estas secuencias intervienen en la expresión basal y en la inducción del gen. Los MREs ejercen su acción independientemente de su posición y orientación, aunque son más activos mientras más cerca del inicio de transcripción se encuentran y la presencia de varios genera efectos sinérgicos (Searle *et al.*, 1987). Realizan su función gracias a la unión de determinados factores de transcripción de los cuales el más importante es el *metal responsive transcription factor-1* (MTF-1) (Westin and Schaffner, 1988; Heuchel *et al.*, 1994). Inicialmente se descubrieron como elementos que

participaban en la inducción por metales de los genes de las MT-I y -II, aunque posteriormente también se les ha implicado en la inducción de estas proteínas por agentes oxidantes (Dalton *et al.*, 1996; Dalton *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 1999).

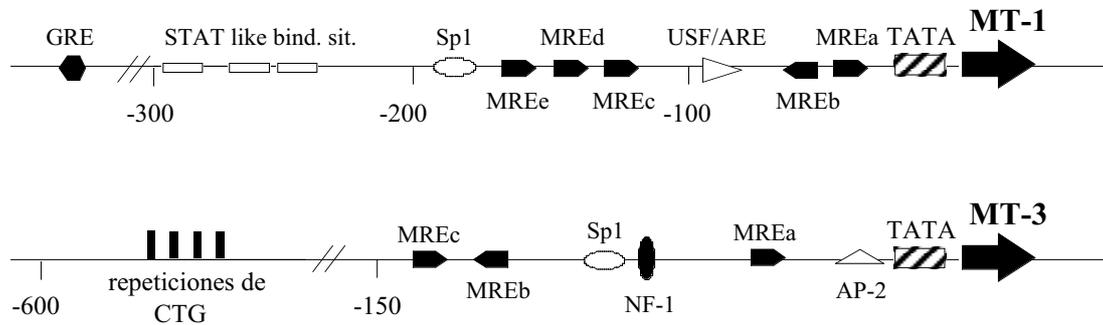


Figura 3. Representación esquemática de la zona promotora de los genes de ratón de MT-I y MT-III. Comparando ambos promotores observamos que en ellos se localizan elementos de respuesta diversos, varios de los cuales están representados en los dos genes. No obstante no se conserva el número ni posición relativa de estos. Se representa la posición en número de pares de bases respecto al inicio de transcripción.

Los *antioxidant response elements* (ARE) (Dalton *et al.*, 1994) se han encontrado en la zona proximal del promotor de la MT-I y -II. Los ARE son elementos que intervienen, como su nombre indica, en la respuesta a sustancias oxidantes, aunque no se puede descartar que participen en la inducción por algunos metales diferentes del Zn, como el Cd (Li *et al.*, 1998). Se ha observado que el MTF-1 y el *upstream stimulator factor* (USF) interaccionan bajo ciertas circunstancias con los ARE (Dalton *et al.*, 1997).

Los *glucocorticoid response element* (GRE) son los responsables de la respuesta a glucocorticoides y se les une el receptor activado de estas hormonas. Se descubrieron en el promotor de MTs humanas a principios de la década de los 80 (Karin *et al.*, 1984) y recientemente en el ratón (Kelly *et al.*, 1997).

En la región comprendida entre -187 y -350 pb del promotor de los genes de la MT-I y -II se sitúa lo que se denominaba la región de respuesta al lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Durnam *et al.*, 1984) debido a que su eliminación provocaba la pérdida de sensibilidad a este inductor. No obstante no se había identificado ningún elemento en *cis* concreto en su interior. En esta y zonas próximas de la secuencia se encuentran varios posibles *elementos de respuesta a la interleuquina-6* (IL-6), tanto del tipo 1 como 2 (Kasutani *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999). A este último tipo se le unen las proteínas tipo *signal transducer and activation of transcription* (STAT).

Además de todos los anteriores encontramos lugares de unión para Sp1 (Andersen *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1987a; Lee *et al.*, 1987b; Mueller *et al.*, 1988), Ap-1 (Lee *et al.*, 1987b) y Ap-2 (Mitchell *et al.*, 1987), que podrían participar en la expresión basal de estos genes.

En el promotor de la MT-III encontramos multirepeticiones del triplete CTG. Esta secuencia, a pesar de no ser un elemento de respuesta típico, podría participar en el control de

la transcripción de la MT-III. Se ha observado *in vitro* que esta región de DNA es capaz de inhibir de manera independiente de su posición y orientación la expresión de diversos genes sin que a ella se una ninguna proteína. Debido a esto se ha especulado que podría constituir un posible mecanismo mediante el cual la expresión de la MT-III estaría inhibida en diversos tejidos (Imagawa *et al.*, 1995). No obstante no existe un consenso respecto a este papel debido a que no se ha detectado esta secuencia en genes de otras especies, con patrón de expresión similar, como es el caso del gen de la MT-III humana (Palmiter *et al.*, 1992). Además la eliminación de esta multirepetición no provoca que se sintetice la MT-III en cultivos celulares en los que habitualmente no se expresa (Moffat *et al.*, 1999).

3.2.3 Control Postranscripcional

A pesar de que el control transcripcional es el principal, en las MT-I y -II de mamífero también se han descrito efectos postranscripcionales. Hasta el momento no se han observado para la MT-III aunque no se puede descartar la posibilidad de que se produzcan. Al cabo de una hora después de la inducción se suelen encontrar niveles elevados de mRNA de MT-I y -II (Hager and Palmiter, 1981) que unidos a una rápida eliminación (vida media de 2 horas) produce un *plateau* a las 6-8 horas (Griffith, 1985). Que la vida media del mRNA sea baja hace suponer que la estabilidad del mensajero se encuentra bajo control, contribuyendo así a una regulación fina de la expresión de las MTs. De hecho se ha observado que la estabilidad del mensajero depende del tipo de estímulo inductor (Mercer and Wake, 1985; De *et al.*, 1991) pudiendo influir por tanto en la cantidad de proteína total.

Finalmente, la concentración de MTs en un momento determinado en la célula viene impuesta también por la degradación de la proteína; aunque posiblemente en este caso concreto, es un mecanismo secundario debido a la alta inducibilidad del gen. Se ha observado que dependiendo del estado de la célula y del estímulo inductor puede variar la vida media de las MT-I y -II. Así, en cultivo de hepatocitos de rata es inversamente proporcional al contenido de Zn celular (Chen and Failla, 1989) y varía su estabilidad en función del inductor. Por ejemplo, es más elevada con Cd que con Zn, y a su vez que con Cu (Bremner *et al.*, 1978; Feldman *et al.*, 1978; Held and Hoekstra, 1984). No obstante, podría ser un reflejo de la eficacia de los sistemas de degradación según el contenido metálico de estas proteínas.

3.3 Inductores

Las MTs son capaces de responder a determinados estímulos. A estos estímulos les denominamos inductores (Tabla 1). Muchos de ellos son capaces de actuar tanto *in vivo* como en cultivo. No obstante, algunos agentes fallan en su inducción en cultivo debido a la ausencia de receptores adecuados o por otras causas más complejas. Se podría hablar, por tanto, de inductores primarios o secundarios en función de si incrementan directamente la síntesis de MTs o no.

Teóricamente los inductores podrían actuar sobre varios de los niveles de regulación descritos en el apartado anterior, aunque el control de la tasa de transcripción es el principal

mecanismo observado en el caso de las MTs. Además, como se deduce de la estructura de la zona promotora, en sus genes pueden confluír diferentes vías de transmisión de señales. A pesar de ser genes con diferentes elementos de respuesta y multiregulados parece obvio que no puede haber un mecanismo individual para cada uno de los inductores.

<p>Metales</p> <p>Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi</p>	<p>Antibióticos</p> <p>Estreptozotocina Cicloheximida</p>
<p>Hormonas y factores de crecimiento</p> <p>Glucocorticoides Progesterona Estrógenos Catecolaminas Glucagón Insulina Angiotensina II IGF-1 EGF</p>	<p>Agentes citotóxicos</p> <p>Hidrocarburos Etanol Isopropanol Cloroformo Tetracloruro de carbono EDTA Acetaminopteno</p>
<p>Agentes inflamatorios y citoquinas</p> <p>LPS Dextrano Turpentina IL-1 IL-6 IFN-α y -γ TNF-α</p>	<p>Agentes estresantes</p> <p>Deprivación Inflamación Irradiación Inmovilización</p>

Tabla 1. Agentes inductores de las MT-I y -II *in vitro* y/o *in vivo*. La lista aunque no es exhaustiva refleja la mayoría de las categorías de inductores de estas proteínas así como los agentes experimentales más utilizados. Adaptado de (Kägi, 1993).

La lista de inductores es extensa y los hay de muy diversa naturaleza. Entre ellos encontramos los metales pesados, hormonas, segundos mensajeros, factores de crecimiento, agentes inflamatorios, vitaminas, antibióticos, agentes citotóxicos, y condiciones estresantes. Además existe una serie de circunstancias que modulan su expresión, como el desarrollo (Nemer *et al.*, 1984), la regeneración tisular (Webb, 1987), y la edad (Waalkes and Klaassen, 1984; Suzuki *et al.*, 1994). También presentan niveles alterados durante procesos patológicos como el cáncer, enfermedades degenerativas o lesiones tisulares. Muchos de los factores

mencionados podrían considerarse como inductores secundarios que afectarían a la expresión de las MTs debido a su influencia sobre los considerados inductores primarios.

3.3.1 Metales

Los metales de transición son los inductores más potentes de las MT-I y -II. La primera vez que se observaron cambios en las cantidades tisulares de estas proteínas fue tras la administración de Cd (Piscator, 1964). Posteriormente se descubrieron otros inductores metálicos como Zn, Cu, Cobalto (Co), Bi, Ag, Hg, Níquel (Ni) y Pb. La administración intraperitoneal (i.p) de estos metales induce la expresión de las MTs sobre todo en hígado, riñón y páncreas (Durnam and Palmiter, 1981b). También pueden provocar el incremento de las concentraciones séricas de MT-I y -II (Garvey and Chang, 1981; Sato *et al.*, 1984; Bremner *et al.*, 1987a; Morrison and Bremner, 1987). En cambio en otros tejidos como el cerebro no se incrementan los niveles de MTs cuando los metales son administrados i.p.

Algunos metales como el Zn y el Cu pueden modular la expresión de las MT-I y -II a través de las cantidades presentes en la dieta (Richards and Cousins, 1976; Menard *et al.*, 1981; Bremner and Morrison, 1986). Los resultados no siempre son iguales para todos los metales y existen diferencias en la respuesta de cada órgano. En general un incremento de la disponibilidad de metal causa inducción de las MT-I y -II y dietas deficientes en estos metales tienen como consecuencia el descenso de la concentración tisular de estas proteínas. Los órganos más sensibles a los cambios causados por la dieta son el hígado y el intestino.

Algunos metales pesados como el Cd, Zn, Cu, Co y Ni han demostrado ser capaces de inducir la síntesis de las MT-I y -II también *in vitro* en células de procedencia hepática (Karin *et al.*, 1980a; Bracken and Klaassen, 1987), aunque otros metales como el Pb no. El que exista cierta inducción en cultivo indica que estos elementos son inductores primarios capaces de iniciar rutas de señalización intracelulares que provocan activación génica sin el concurso de otros factores adicionales. No obstante es improbable que existan diferentes rutas de señalización para cada uno de ellos (Palmiter, 1994).

El cerebro es un órgano aislado del exterior mediante la barrera hematoencefálica que limita la libre difusión de la mayoría de sustancias solubles en agua, como es el caso de los iones de Zn, Cd i Cu. Este hecho se ve reflejado en la ausencia de inducción de las MTs cerebrales por administración i.p de Zn (Itoh *et al.*, 1983). No obstante los genes de las MTs cerebrales poseen la capacidad de responder a cambios en la concentración de metales pesados. En este sentido, las MT-I y -II cerebrales responden a dietas deficientes en Zn disminuyendo de manera global su expresión (Ebadi and Hama, 1986). Por otra parte la administración intracerebroventricular (i.c.v) de Zn o Cd (Ebadi, 1986; Paliwal *et al.*, 1990; Choudhuri *et al.*, 1993) produce un incremento tanto de los mRNA para MT-I y -II (Paliwal *et al.*, 1990; Hao *et al.*, 1994) como de sus niveles proteicos (Ebadi and Hama, 1986). Las áreas cerebrales que se inducen por la administración de Zn se correlacionan bien con aquellas que acumulan este metal (Gasull *et al.*, 1994b). Al igual que ocurre con células hepáticas, cultivos de astrocitos (Kodama *et al.*, 1991; Hidalgo *et al.*, 1994a; Sawada *et al.*, 1994; Kramer *et al.*,

1996a), neuronas (Hidalgo *et al.*, 1994a; Kramer *et al.*, 1996b) y microglia (Agullo *et al.*, 1998) son inducibles por Zn y Cu.

Contrariamente a lo que ocurre con las MT-I y -II, la MT-III no parece responder a la administración de metales ya sea i.p, i.c.v o en cultivo. El único efecto que se ha observado es una pequeña disminución de sus niveles tanto en cultivo de neuronas (Kramer *et al.*, 1996b) como *in vivo* (Zheng *et al.*, 1995a) tras el tratamiento con Zn o Cd. Estos resultados indican claramente que la MT-III presenta un mecanismo de regulación completamente diferente al de las otras isoformas.

Desde la clonación de los genes de las MTs quedó claro que los MREs eran las zonas del promotor implicadas en la inducción por metales (Stuart *et al.*, 1984; Foster and Gedamu, 1991). Posteriormente se han identificado diferentes proteínas que se unen a esta región tanto en los roedores (MTF-1) (Radtke *et al.*, 1993; Brugnera *et al.*, 1994) como en los humanos (Otsuka *et al.*, 1994), tanto en situación basal como en respuesta a los metales (Heuchel *et al.*, 1994). Se ha visto que todos los metales inductores de las MTs ejercen su acción a través del MTF-1 puesto que células knockout (KO) para esta proteína (Heuchel *et al.*, 1994) o tratados con mRNA antisentido de MTF-1 (Palmiter, 1994) no incrementan la síntesis de MTs en respuesta a ningún metal. El MTF-1 se activa gracias a la disociación de un inhibidor que probablemente actúe como sensor de Zn (Palmiter, 1994; Palmiter, 1999) (figura 4). No obstante, no se pueden descartar otros mecanismos como la ruta vía ARE/USF observada para el Cd a través de estrés oxidativo secundario (Dalton *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1998; Chu *et al.*, 1999).

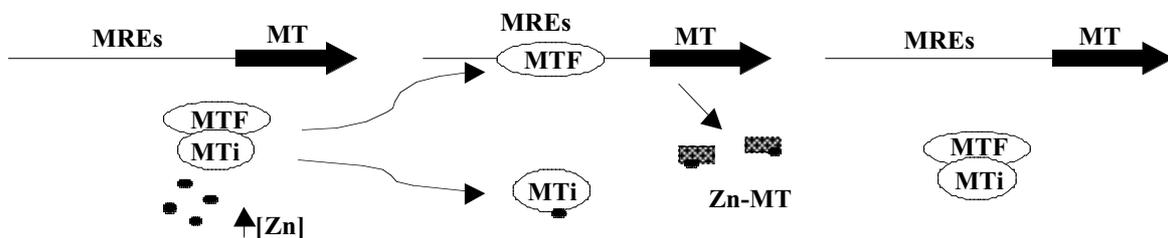


Figura 4. Modelo de la regulación de los genes de las MT-I y -II por incrementos en la concentración citosólica de Zn. El factor de transcripción MTF-1, en condiciones normales, estaría unido a un factor inhibidor (MTi) que sería el sensor de Zn. Ante una elevación de la concentración de Zn, el MTi une este metal con lo cual se disocia del MTF. En estas circunstancias el MTF puede unirse a los MREs presentes en la zona promotora de los genes de las MT-I y -II. Como consecuencia se incrementa la síntesis de tioneínas que al complejarse con el Zn provocaran un descenso de la concentración citosólica de este metal, retornándose a la situación inicial. Adaptado de (Palmiter, 1994)

3.3.2 Hormonas

Diferentes tipos de hormonas han demostrado intervenir en el control de las MTs. En este sentido el órgano más estudiado es el hígado. Hay que destacar que el efecto de las hormonas sobre las MTs no es el mismo entre los diferentes órganos y que puede estar

modulado en función de otros estímulos independientes que lleguen a la célula y del estado nutricional y metabólico de esta.

Las hormonas más estudiadas, desde el punto de vista de regulación de las MTs, son los glucocorticoides, a pesar de que su efecto sobre estas proteínas es relativamente modesto. Como se ha comentado actúan sobre las MTs a través de la unión del complejo hormona-receptor a los GREs (Karin and Herschman, 1980b; Karin *et al.*, 1980b).

La administración i.p de corticosterona (Brady and Helvig, 1984b) como del glucocorticoide sintético dexametasona (Etzcel *et al.*, 1979) es capaz de inducir las MT-I y -II hepáticas y cerebrales (Palmiter *et al.*, 1992; Zheng *et al.*, 1995b). En el caso del cerebro, el efecto no es igual en todas las áreas, incrementándose la producción de MT-I+II en la corteza, médula+puente, hipocampo y cerebelo pero no hipotálamo (Gasull *et al.*, 1994b).

En cultivos celulares, tanto los glucocorticoides endógenos como los sintéticos modulan las MT-I y -II. Incrementan la síntesis de estas proteínas en hepatocitos (Failla and Cousins, 1978; Karin and Herschman, 1979; Karin *et al.*, 1980a; Karin and Herschman, 1980a; Karin and Herschman, 1980b; Karin *et al.*, 1980b; Mayo and Palmiter, 1981), astrocitos y neuronas (Hidalgo *et al.*, 1994a; Kramer *et al.*, 1996a; Kramer *et al.*, 1996b) pero no la microglia (Agullo *et al.*, 1998).

A pesar de ejercer un efecto inductor sobre las MTs hepáticas y cerebrales, el control global es claramente diferente en hígado que en cerebro. La administración crónica de ACTH no afecta, paradójicamente, a las MT hepáticas (Hidalgo *et al.*, 1988c) mientras que incrementa de manera significativa sus niveles en el cerebro (Gasull *et al.*, 1994b). Las diferencias se acentúan a la luz de los resultados obtenidos mediante la extirpación quirúrgica de las glándulas adrenales (adrenalectomía; ADX). Este tratamiento experimental provoca un incremento de los niveles basales de las MTs hepáticas (Brady and Burger, 1979; Hidalgo *et al.*, 1988c) sugiriendo un papel inhibitor de estas hormonas en condición basal. Estos resultados se ven confirmados por los datos obtenidos mediante inhibidores del receptor de los glucocorticoides RU486 (Hidalgo *et al.*, 1988b). Por tanto, en el hígado los glucocorticoides tendrían un papel positivo o negativo dependiendo de la situación fisiológica. Se ha sugerido que podría ser debido a una regulación diferencial de varios *pools* de MTs (Min *et al.*, 1993). Por el contrario en el cerebro la ADX reduce los niveles basales de MT-I+II en algunas áreas cerebrales (Gasull *et al.*, 1994b; Belloso *et al.*, 1996).

Aunque en cultivo se ha demostrado un efecto directo y su administración *in vivo* así lo sugiere, los datos con inhibidores y ADX no lo refrendan. Es posible que su efecto fisiológico sea producido a través de otras moléculas o alteraciones globales en el organismo. Son bien conocidas las interacciones entre diferentes sistemas hormonales, el sistema nervioso y el inmunitario. Por tanto es probable que sea la matriz resultante de todas estas interacciones la que controle la expresión definitiva de las MTs. No obstante ha quedado demostrado que el efecto de los glucocorticoides sobre las MTs hepáticas es independiente de los niveles de Zn (Mayo and Palmiter, 1981), del glucagón (Etzcel and Cousins, 1981) y de la IL-1 (DiSilvestro and Cousins, 1984a).

Las catecolaminas, en concreto la epinefrina y norepinefrina, cuando son administradas i.p inducen las MTs hepáticas (Brady and Helvig, 1984a). También poseen un efecto inductor sobre hepatocitos en cultivo (Cousins and Coppen, 1987). Por el contrario los únicos datos que se tienen en cerebro parecen indicar que al menos un miembro de esta familia, la dopamina, actuaría como inhibidor de las MT-I y -II en condición basal; puesto que la administración de antagonistas para la dopamina incrementan los niveles basales de estas proteínas en algunas áreas cerebrales (Gasull *et al.*, 1994a).

Los opiáceos (Hidalgo *et al.*, 1991b), el glucagón (Etzcel and Cousins, 1981; Helvig and Brady, 1984) y la angiotensina II (Helvig and Brady, 1984) administrados i.p también incrementan las MTs hepáticas aunque en general los efectos son modestos. Parecen actuar directamente sin necesidad de iniciar otras reacciones en el organismo puesto que o bien se ha demostrado su acción también *in vitro*, como en el caso del glucagón sobre cultivos de hepatocitos (Cousins and Coppen, 1987) o su efecto es neutralizado por el uso de inhibidores específicos como es el caso de la morfina (Hidalgo *et al.*, 1991b). Se ha sugerido que los efectos de las hormonas peptídicas sobre las MT-I y -II están mediados por la activación de la adenilato ciclasa (Brady *et al.*, 1987; Cousins and Coppen, 1987; Min *et al.*, 1993).

Sobre la MT-III, los datos que se tienen acerca de la regulación hormonal son escasos y se refieren exclusivamente a los glucocorticoides. La administración i.p de glucocorticoides a ratones no provoca cambios (Palmiter *et al.*, 1992) o causa un ligero descenso (Zheng *et al.*, 1995b) en la expresión de la MT-III. En consonancia con estos resultados, la ADX tiene como consecuencia un pequeño descenso en los niveles basales del mRNA de MT-III (Belloso *et al.*, 1996). En cultivos celulares los efectos son igualmente discretos. En astrocitos se ha observado un modesto incremento del mRNA para MT-III (Belloso *et al.*, 1996), aunque otros autores no han podido determinar ningún cambio (Kramer *et al.*, 1996a). En cuanto a cultivos primarios de neuronas, la administración de glucocorticoides causa un pequeño descenso del mRNA de MT-III en concordancia con lo observado *in vivo* (Belloso *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1996b). En conjunto, estos resultados sugieren que el control hormonal no es muy importante en la regulación de la expresión de la MT-III.

3.3.3 Citoquinas

Las citoquinas son proteínas que actúan como mediadores intercelulares, en muchos sentidos semejantes a las hormonas; aunque clásicamente, debido a su estrecha relación con el sistema inmunitario, no se han considerado como tales. Se sintetizan en múltiples tipos celulares, pueden iniciar cascadas de síntesis de citoquinas y son pleiotrópicas. Intervienen en la respuesta inmunitaria y la inflamación; participan en procesos de diferenciación y proliferación celular; modulan el metabolismo y se han implicado en numerosos procesos patológicos. Pueden desencadenar respuestas del sistema nervioso y endocrino, y a su vez estos últimos pueden modular la expresión y la función de las citoquinas.

El hecho que las MT-I y -II sufran cambios de expresión durante procesos inflamatorios (Sobocinski *et al.*, 1978; Sobocinski and Canterbury, 1982) ha propiciado que se proponga a

las citoquinas como posibles mediadores de la inducción de las MTs. Las principales candidatas, por encontrarse en el inicio de la regulación de cascadas de citoquinas y por modular la respuesta inflamatoria son la interleuquina(IL)-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF- α). De todas maneras otras citoquinas como los interferones (IFN) también han demostrado causar efectos sobre las MT-I y -II.

Interleuquina-1 (IL-1)

Existen dos isoformas de la IL-1, la α y la β , que interactúan con el mismo receptor. Principalmente son sintetizadas por macrófagos aunque también se ha detectado su expresión en otras células del sistema inmune (S.I.) como monocitos, células endoteliales, linfocitos B y T; y otras no directamente relacionadas con el S.I., como fibroblastos, queratinocitos, células del músculo liso, astrocitos y microglia.

A bajas concentraciones la IL-1 afecta fundamentalmente al S.I., activa la proliferación y diferenciación de linfocitos y células efectoras de la inflamación como monocitos y células endoteliales. Su acción puede multiplicarse gracias al inicio de cascadas de citoquinas. Entre otras puede incrementar la síntesis de IL-6 y TNF- α . A altas concentraciones entra en el torrente sanguíneo actuando de manera endocrina. En estas circunstancias induce la síntesis de las proteínas de fase aguda hepáticas y modula el metabolismo de proteínas, lípidos y glúcidos. Puede afectar también al SNC: produce fiebre, modula la liberación de neurotransmisores, activa el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) y en último término puede causar alteraciones conductuales.

El papel de la IL-1 como inductora de las MT-I y -II es bien conocido. Tras ser administrada i.p causa un incremento de las MTs hepáticas de rata y ratón (DiSilvestro and Cousins, 1984a; Cousins and Leinart, 1988; De *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991), así como en la médula ósea y timo de rata (Cousins and Leinart, 1988). Por el contrario no afecta a otros órganos como el útero y los ovarios de ratón (De *et al.*, 1990). Parece que esta acción es independiente de los glucocorticoides, puesto que la ADX (DiSilvestro and Cousins, 1984a) y la hipofisectomía (De *et al.*, 1990) no afectan al incremento de los niveles de MTs hepáticos por la administración de IL-1. No obstante no puede descartarse que el efecto detectado sea debido a la mediación de otras citoquinas puesto que, como se ha comentado, la IL-1 es un potente inductor de la IL-6 y el TNF- α . En este sentido la administración exógena de IL-1 causa incremento de la producción de IL-6 y TNF- α en aquellos tejidos en los cuales se ha observado inducción de MT-I y -II (De *et al.*, 1990).

La IL-1 también afecta a la síntesis de MT-I y -II en cultivos celulares. Debido a esto se cree que se trata de un inductor primario. No obstante, no todos los sistemas de cultivo son igualmente sensibles a esta citoquina. La IL-1 induce las MT-I y -II en algunas líneas celulares (Karin *et al.*, 1985; Kondo *et al.*, 1994). No obstante, en cultivos primarios de hepatocitos no afecta a la expresión de las MTs (Schroeder and Cousins, 1990). Las discrepancias observadas entre líneas celulares y cultivos primarios, pueden ser debidas a variaciones en el

status fisiológico celular o a la necesidad de la presencia de factores adicionales que no son esenciales para las células transformadas.

No se ha estudiado el efecto de la administración i.p de IL-1 sobre las MTs cerebrales, aunque el suplemento i.c.v de esta citoquina incrementa los niveles de MT-I+II en el estriado, hipotálamo, médula+puente (M+P) y en el cerebelo (Hernández and Hidalgo, 1998). No obstante los cultivos primarios de neuronas y astrocitos no son inducibles por IL-1 (Hidalgo *et al.*, 1994a; Kramer *et al.*, 1996a; Kramer *et al.*, 1996b). Estos resultados sugieren que su efecto *in vivo* a nivel de SNC son debidos más que a una acción directa de esta citoquina, a alteraciones secundarias, como podría ser la inflamación. Por otra parte, de manera análoga a lo observado en cultivos de células periféricas, cultivos de líneas celulares, en concreto procedentes de astrocitomas (Kikuchi *et al.*, 1993; Sawaki *et al.*, 1994) y neuroblastomas (Bauer *et al.*, 1993) sí que responden a la adición de IL-1 en el medio.

Hasta la fecha no existen datos sobre la MT-III *in vivo* respecto a la posible inducción de la IL-1. En cultivos celulares de astrocitos de rata, se ha observado un ligero descenso sobre los niveles de mRNA para MT-III pero no sobre los niveles proteicos, tras el tratamiento con IL-1 β (Uchida, 1999). Por el contrario en otros experimentos no se ha detectado ningún efecto de esta citoquina sobre astrocitos (Kramer *et al.*, 1996a; Kramer *et al.*, 1996b) ni microglia (Agullo *et al.*, 1998) en cultivo.

Interleuquina-6 (IL-6)

La IL-6 se expresa en células típicamente inmunes como monocitos, macrófagos y linfocitos; y de otras partes del organismo como hepatocitos, fibroblastos, células endometriales, astrocitos y neuronas. Su receptor, que funciona en asociación con gp130, es una proteína de membrana (Yamasaki *et al.*, 1988) distribuida en muchas células del organismo incluso del SNC. Su activación causa cascadas intracelulares de fosforilaciones que acaban en la transactivación de diversos factores de transcripción, entre ellos la familia de los STAT. Debido a la distribución de su receptor, las funciones de la IL-6 no están restringidas al S.I. (activación de células T, maduración de B, entre otras) sino que son más amplias. Tiene efectos sobre la formación del hueso, inhibe el crecimiento de carcinomas y linfomas, regula la respuesta de fase aguda e interviene en el metabolismo mineral. Sus acciones afectan también al funcionamiento del sistema nervioso y el endocrino. En este sentido, entre otros efectos, activa el eje HPA, puede provocar fiebre, interviene en la diferenciación de neuronas y es capaz de iniciar cascadas inmunitarias en el SNC donde puede desencadenar una respuesta inflamatoria. Finalmente, se ha implicado a la IL-6 en numerosas patologías autoinmunes y degenerativas como el SIDA, la enfermedad de Alzheimer (AD), o la esclerosis múltiple.

La IL-6 posee potentes efectos sobre la expresión de las MTs. La administración i.p de IL-6 causa inducción del mRNA de MT-I y -II en el hígado de rata y de ratón (De *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 1994) pero no en otros tejidos como el ovario y útero (De *et al.*, 1990). Sorprendentemente, en tejidos típicamente inmunes, como la médula ósea, la IL-6 no parece contribuir a la regulación de las MTs (Huber and Cousins, 1993). Finalmente, en el

cerebro su administración i.c.v en ratas produce un incremento de MT-I+II pero sólo en determinadas áreas, en concreto: la corteza frontal, el hipotálamo y el cerebelo (Hernández and Hidalgo, 1998).

En nuestro laboratorio, hemos utilizado como modelo de estudio de la regulación de las MTs cerebrales por la IL-6, animales que sobreexpresan esta citoquina en astrocitos del SNC, denominados animales GFAP-IL6, en referencia al promotor que controla la expresión del transgén (Campbell *et al.*, 1993). Estos animales presentan niveles de MT-I+II superiores a los determinados en los animales controles, mientras que la MT-III tiende a disminuir (Hernández *et al.*, 1997b). Estos resultados indican que la IL-6 también podría controlar la expresión de las MTs cerebrales. No obstante, de los resultados obtenidos con estos animales, no podemos deducir que la IL-6 sea un regulador directo de las MTs puesto que, como veremos más adelante, en ellos se produce una inflamación muy acusada, acompañada de estrés oxidativo, lo que altera la expresión de otros muchos factores. Teóricamente, cualquiera de ellos podría ser el causante de los cambios de expresión detectados en las MTs cerebrales.

Contrariamente a lo observado *in vivo*, la respuesta de las MTs a la administración de IL-6 en cultivo es menos clara. Generalmente los cultivos celulares o no responden a la IL-6 o necesitan de la presencia en el medio de factores adicionales para poder incrementar la síntesis de MTs. Hepatocitos recién aislados de rata no responden a la administración de IL-6 (Coyle *et al.*, 1993b; Coyle *et al.*, 1993a) y en cultivo primario se necesita la presencia de glucocorticoides en el medio para inducir la síntesis de MT-I y -II (Schroeder and Cousins, 1990). Por otra parte, cultivos primarios de astrocitos de rata (Hidalgo *et al.*, 1994a; Kramer *et al.*, 1996a) y de ratón (Hernández *et al.*, 1997b) no varían la expresión de MT-I y -II en respuesta a la administración de IL-6. Además, contrariamente a lo que ocurría con la IL-1, determinadas líneas celulares procedentes de astrocitoma humano y cultivos hipocampales tampoco responden a esta citoquina (Sawada *et al.*, 1994). El único caso de células procedentes del SNC que son inducibles por IL-6 son las células SH-SX5X aisladas de neuroblastoma humano (Bauer *et al.*, 1993).

Factor de necrosis tumoral (TNF- α)

El TNF- α ejerce su función a través de dos receptores, el TNFR1 y TNFR2 (Tartaglia and Goeddel, 1992), aunque el primero parece ser el más importante. Se sintetiza en diversas células del organismo, principalmente en macrófagos, linfocitos T, células *natural killer* y otras poblaciones celulares no inmunitarias como los astrocitos o la microglia. La activación de las células por el TNF- α puede inducir la síntesis y liberación de otras citoquinas, entre ellas la IL-1 y la IL-6. Por tanto el TNF- α es capaz de iniciar cascadas de citoquinas que conducen a la amplificación y diversificación del efecto inicial. Como en el caso de las demás citoquinas, es difícil estudiar sus funciones puesto que es fácil confundir sus efectos directos con los causados indirectamente a través de la inducción de otras citoquinas.

A bajas concentraciones el TNF- α posee acciones fundamentalmente a nivel del sistema inmunitario. Estimula la síntesis de moléculas de adhesión, activa células fagocíticas

mononucleares y polimorfonucleares; estimula la acción de linfocitos T y B, y posee acción antivírica. Si su producción es masiva puede pasar al torrente sanguíneo y actuar como si fuera una hormona. En este caso sus funciones son muy diversas; estimula la síntesis de proteínas de fase aguda, induce el catabolismo de lípidos y proteínas, puede actuar a nivel del SNC en la regulación neuroendocrina y puede provocar fiebre. Al igual que otras citoquinas podría participar en la patogenia y/o progresión de varias enfermedades, entre ellas, el cáncer, el SIDA, la AD, y la esclerosis múltiple.

La administración exógena de TNF- α por vía i.p causa incremento de las MTs hepáticas de ratón y de rata pero no afecta a otros tejidos como el ovario y el útero (De *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 1994). Por el contrario provoca un descenso de las MTs renales y del bazo (Sato *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 1994). Como en respuesta al TNF- α se produce secreción de otras citoquinas, como la IL-1 y la IL-6, el efecto sobre las MTs podría estar mediado en parte por la cascada de citoquinas que provoca (De *et al.*, 1990; McIntosh, 1994).

En cultivo, el TNF- α no afecta a la expresión de las MTs en hepatocitos de rata recién aislados (Coyle *et al.*, 1993b), aunque sí en cultivos primarios de estas células (Hernandez *et al.*, 1996). Contrariamente a lo observado para la IL-6 no aparece ningún efecto sinérgico o permisivo con los glucocorticoides. También es un modulador positivo en cultivos de fibroblastos y en células HeLa (Sciavolino and Vilcek, 1995). Con estos resultados podemos considerar al TNF- α como candidato a inductor primario de las MTs.

No se ha determinado hasta el momento el posible papel del TNF- α como agente regulador de las MTs a nivel del SNC. Los datos mostrados en esta tesis son los primeros en el estudio del posible papel fisiológico de esta citoquina sobre la expresión de las MTs cerebrales.

Interferón (IFN).

Los interferones son una familia de proteínas agrupadas en dos subclases: de tipo I (α y β) y de tipo II (γ). Los del tipo I se producen en leucocitos y fibroblastos. Ambos tienen el mismo receptor por lo que sus acciones se solapan. El IFN- γ se sintetiza principalmente en linfocitos T. En este caso su receptor es diferente del anterior. También se producen aunque de forma minoritaria en astrocitos y neuronas.

Los interferones tipo I tienen una función claramente antivírica y representan la primera línea de defensa frente a este tipo de infecciones. Por el contrario el IFN- γ además de un efecto antivírico tiene otras acciones más generales sobre el S.I y el resto de tejidos. Sus funciones son, en general, similares a las de las citoquinas comentadas anteriormente. Provoca la activación de varios tipos celulares (macrófagos, linfocitos, células endoteliales, neutrófilos), induce de la síntesis de proteínas de fase aguda, activa el catabolismo de lípidos, activa el eje HPA y puede actuar como pirógeno. Pueden estar implicados en varias enfermedades autoinmunes.

Los IFNs han mostrado un efecto inductor sobre las MTs en varios sistemas de cultivos celulares, aunque con resultados dispares. El IFN- α induce las MTs en células derivadas del

neuroblastoma humano T986 (Friedman and Stark, 1985) en HeLa y RD-114 (Kusari *et al.*, 1987) y en células CHO de hámster (Morris and Huang, 1987), siendo en este último caso la inducción independiente de la concentración de Zn en el medio de cultivo. El IFN- β induce las MT-I y -II tanto en células HeLa como en cultivo primario de fibroblastos (Sciavolino and Vilcek, 1995). Finalmente el IFN- γ ha mostrado poder inducir las MT-I y -II en células HeLa, líneas celulares de macrófagos (Kusari *et al.*, 1987; Farber, 1992) y en cultivos primarios de astrocitos y microglia (Vanguri, 1995). No obstante, los hepatocitos en cultivo responden de una manera muy débil a su administración (Coyle *et al.*, 1993b; Hernandez *et al.*, 1996).

El hecho de que los IFNs modelen la expresión de las MTs en muy diversos tipos celulares en cultivo sugiere que son inductores primarios. En este sentido se identificó en el promotor de las MTs una secuencia análoga a otros genes inducidos por el IFN- α (Friedman and Stark, 1985).

In vivo, la administración i.p de IFN- γ en ratón (De *et al.*, 1990), como los IFN tipo I en rata (Sato *et al.*, 1996b) provoca un incremento de los mRNAs de MT-I y MT-II en el hígado. No obstante, tanto los resultados obtenidos en cultivo como *in vivo* en animales suplementados con estas citoquinas, no tienen por que corresponder con el papel fisiológico de los IFNs puesto que se alteran considerablemente las condiciones ambientales y/o se supera el rango fisiológico de concentración de estas citoquinas. Para solventar esta dificultad se han utilizado ratones KO para el receptor del IFN- γ (Arbonés *et al.*, 1994). En estos animales no se ha podido detectar ningún efecto sobre los niveles basales hepáticos ni cerebrales de MTs (Hernández *et al.*, 1997a). Estos resultados ponen en duda que el IFN- γ sea un regulador fisiológico de las MTs al menos en situación basal.

De manera análoga a los estudios con los animales KO para el receptor del IFN- γ , en la presente tesis he utilizado animales modificados genéticamente para estudiar el papel de la IL-6 y el TNF- α en la regulación de las MTs.

3.3.4 Estrés

Además de los inductores comentados más arriba, otra serie de moléculas de muy diversa naturaleza son capaces de inducir las MTs hepáticas. Entre ellos encontramos agentes alquilantes (Kotsonis and Klaassen, 1979; Bauman *et al.*, 1991), disolventes orgánicos (Oh *et al.*, 1978), drogas anticancerígenas (Bauman *et al.*, 1991; Naganuma *et al.*, 1993) y herbicidas (Bauman *et al.*, 1991; Sato, 1991). El efecto sobre las MTs cerebrales ha sido menos estudiado. En cualquier caso, no parecen ser inducibles por el tratamiento con este tipo de factores (Ebadi *et al.*, 1992; Zheng *et al.*, 1995a; Satoh *et al.*, 1996). En el caso concreto de la MT-III se ha observado una pequeña disminución de los niveles de su mRNA por la administración de alguno de ellos como el etanol (Zheng *et al.*, 1995a).

Dada la diversidad y naturaleza extraorgánica de la mayoría de estos compuestos es difícil pensar que puedan existir mecanismos de respuesta específicos. Es muy probable que muchos de ellos induzcan las MTs de una manera inespecífica a través de la producción de una respuesta secundaria en el organismo, como una respuesta al estrés, una inflamación ó

sobreproducción de radicales libres. Este hecho se ve reforzado por la ausencia de inducción, de la mayoría de estos compuestos, en cultivos celulares. Discutiremos aquí el estrés y más adelante la inflamación y el estrés oxidativo.

El estrés es un concepto amplio que engloba muchas situaciones de diversa índole. Desde un punto de vista genérico podríamos decir que respuesta al estrés es la respuesta del organismo, desarrollada durante la evolución, a cualquier perturbación de la homeostasia. Muchas veces se confunde estrés con la respuesta al estrés. Desde el punto de vista de esta tesis consideraremos estímulo estresante o *stressor* al agente causal, el término estrés para definir el estado del organismo y la respuesta al estrés como el conjunto de cambios fisiológicos iniciados. El agente estresante puede causar un peligro real para el organismo pero esta no es una condición imprescindible ya que alteraciones de tipo psicológico también pueden provocar estrés. En este sentido se ha propuesto que el estrés se puede desencadenar por agentes que pongan en peligro la integridad del organismo de forma simbólica o real (Vigas, 1980). La definición de estrés mencionada implica la necesidad de percibir el estímulo como diferente a una situación cotidiana, pero no necesariamente ha de ser una percepción consciente, sino que la respuesta al estrés puede ser desencadenada de una manera refleja.

En esta respuesta del organismo destacan la activación y el papel que juegan los ejes simpaticomeduloadrenal y el HPA, aunque también se observan alteraciones en otros sistemas. Se trata por tanto de una respuesta general, poco específica, que puede ser desencadenada por muchos estímulos diferentes. No obstante, las características concretas dependen de diferentes factores como la naturaleza, intensidad y duración del estímulo. Los estímulos estresantes incluyen cambios en el medio interno (lesión tisular, infección, alteraciones del estado de oxidación), cambios en el medio externo (frío, calor etc.) o alteraciones psicológicas (miedo, ansiedad, etc.).

Se ha observado que estímulos estresantes de los tres tipos mencionados son capaces de inducir las MTs, al menos las MT-I y -II, sugiriendo que estas proteínas forman parte de la respuesta al estrés. Entre los diferentes estímulos inductores encontramos la privación de alimentos (Bremner and Davies, 1975), el ejercicio físico, calor o frío (Oh *et al.*, 1978; Beattie *et al.*, 1996), radiaciones UV (Karin, 1985), radiación X (Shiraishi *et al.*, 1986), la inflamación (Sobocinski and Canterbury, 1982), alteraciones en el estado de oxidación (Sato and Bremner, 1993), la limitación de movimientos (*restraint*) o la inmovilización total (Hidalgo *et al.*, 1986a; Hidalgo *et al.*, 1986b).

Es obvio por la naturaleza de los estímulos que desencadenan el estrés, que el efecto que ejercen sobre las MTs ha de ser mediado por respuestas originadas en el organismo. En este sentido, en los pocos casos que es posible, como el estrés por exposición a calor o radiaciones, el estudio en cultivo de células humanas y de roedores demuestra efectivamente que estos estímulos estresantes no son inductores de las MTs *per se* sino que necesitan una respuesta orgánica para producir su efecto sobre estas proteínas (Fornace *et al.*, 1988). Probablemente, la única excepción a esta regla la representan las radiaciones UV (Karin,

1985). La respuesta orgánica, en cada caso es ligeramente diferente aunque como se ha mencionado comparten muchas características. Desde el punto de vista de la regulación de las MTs son varias las alteraciones que nos interesan. Se produce un incremento de la liberación de hormonas a la circulación, destacando los glucocorticoides y las catecolaminas. Las citoquinas también participan en esta respuesta aunque su importancia relativa puede variar dependiendo de la naturaleza del estímulo. Finalmente, en la mayoría de estos casos se produce un estrés oxidativo asociado, ya sea directamente por el tratamiento o como consecuencia de los mecanismos de defensa que se generan.

Estrés por inmovilización

Nuestro grupo de trabajo ha estado interesado durante muchos años en la inducción de las MTs durante modelos psicogénicos de estrés, como la inmovilización total o parcial, así como en la búsqueda de los mediadores endógenos que participan. Tras la exposición aguda al estímulo estresante se inducen las MT-I y -II en ratas (Hidalgo *et al.*, 1986a; Hidalgo *et al.*, 1986b; Hidalgo *et al.*, 1987b; Hidalgo *et al.*, 1988a; Hidalgo *et al.*, 1988b; Hidalgo *et al.*, 1990; Hidalgo *et al.*, 1991a; Giralt *et al.*, 1993) y ratones (Belloso *et al.*, 1996). No obstante la exposición crónica no ejerce un efecto significativo sobre los niveles de estas proteínas (Armario *et al.*, 1987; Hidalgo *et al.*, 1994b).

El órgano en el que se detectan los cambios más drásticos, desde el punto de vista de las MTs, es el hígado. No obstante el estrés por inmovilización también incrementa las MT-I y -II, aunque en menor medida, en otros órganos, como corazón y cerebro (Hidalgo *et al.*, 1990), así como en suero (Armario *et al.*, 1987; Hidalgo *et al.*, 1988b; Giralt *et al.*, 1993). El efecto en el cerebro es dependiente del área estudiada (Hidalgo *et al.*, 1991a). Así el análisis detallado nos revela que las zonas que responden consistentemente son: la corteza frontal, M+P, hipotálamo y cerebelo (Hidalgo *et al.*, 1991a; Hidalgo *et al.*, 1994b). Se ha comprobado que el efecto del estrés por inmovilización sobre las MT-I+II es dependiente de la intensidad y duración del estímulo estresante y parcialmente, al menos en el hígado, a la privación de alimentos que necesariamente acompaña a estos modelos experimentales (Hidalgo *et al.*, 1986b). En cuanto a la MT-III existen pocos datos. Los resultados que se tienen confirman que esta isoforma no responde a los mismos estímulos que las MTs ubicuas. En todo caso se observa un ligero descenso general, aunque en algunas áreas como el cerebelo hay una tendencia al alza (Belloso *et al.*, 1996).

Durante el estrés por inmovilización se produce un descenso de los niveles de Zn circulante en beneficio de los hepáticos. Podría pensarse que la inducción de las MTs hepáticas es consecuencia de la recaptación y consiguiente incremento de la concentración de Zn citoplasmático. No obstante, la inducción de las MTs precede a la acumulación de Zn, lo cual descarta totalmente la hipótesis anterior (Hidalgo *et al.*, 1990). Por tanto deberíamos considerar la elevación de los niveles de MTs como causa y no consecuencia del incremento de Zn hepático.

Descartada la inducción por fenómenos asociados como la privación y el incremento de Zn hepático se han de buscar otros responsables para la regulación de las MTs durante el estrés. Posibles candidatos son los glucocorticoides y/o las catecolaminas puesto que ambos son inductores primarios de las MTs y se incrementa la liberación a la circulación durante el estrés. No obstante la ADX no causa un descenso de los niveles de MT-I+II durante el estrés en rata sino que los incrementa (Hidalgo *et al.*, 1988b). Resultados similares se obtienen mediante la administración del antagonista de los glucocorticoides RU486 (Hidalgo *et al.*, 1988b). Además este efecto es revertido por la administración de corticosterona en la bebida (Hidalgo *et al.*, 1988b). En el ratón, la ADX tiende a disminuir ligeramente los niveles de MT-I+II inducidos por el estrés aunque su efecto es marginal (Belloso *et al.*, 1996) tanto en hígado como en el cerebro. Por el contrario tratamientos con antagonistas de los glucocorticoides, RU486, causan un severo descenso en la inducción por estrés (Ghoshal *et al.*, 1998). Estos resultados indican que, como mínimo en el ratón, el receptor de los glucocorticoides estaría implicado en la inducción por el estrés de las MTs hepáticas.

Los tratamientos con bloqueantes de los receptores de las catecolaminas y de opiodes no causan ningún efecto sobre la inducción de las MT-I+II por el estrés a nivel hepático (Hidalgo *et al.*, 1987a; Hidalgo *et al.*, 1991b) ni en el SNC (Gasull *et al.*, 1994a).

El estrés puede modular la respuesta inmune (Khansari *et al.*, 1990) y se ha observado que la IL-6 y el TNF- α incrementan sus niveles en suero como consecuencia de la exposición a diferentes estímulos estresantes (Lemay *et al.*, 1990; Yamasu *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1993). Dado que las citoquinas poseen un claro efecto inductor sobre las MT-I y -II cuando son administradas i.p o en cultivo, podrían ser factores que interviniesen en el control de estas proteínas durante el estrés psicológico. El estudio del efecto de la IL-6 y el TNF- α sobre las MTs durante el estrés es uno de los objetivos de esta tesis.

3.3.5 Respuesta inflamatoria

La infección induce la síntesis de MTs en el hígado (Sobocinski *et al.*, 1978). Este efecto probablemente sea debido a la inflamación asociada y no a procesos puramente inmunitarios (Sobocinski and Canterbury, 1982). Posteriormente se han utilizado diversas aproximaciones experimentales para estudiar el efecto de la inflamación aguda sobre las MTs en ausencia de infección. Los agentes experimentales más estudiados son el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y la turpentina. El LPS, también denominado endotoxina, es una molécula derivada de la pared bacteriana de los gram negativos. Es un potente antígeno T-independiente, es decir capaz de activar los linfocitos B de manera independiente de las células T. Su administración produce incremento de la síntesis de citoquinas proinflamatorias en diversos órganos (Butler *et al.*, 1989; De *et al.*, 1990) incluidos el hígado y el cerebro, que conducen a una respuesta de fase aguda generalizada. Por el contrario la turpentina es un aceite mineral que administrado subcutáneamente causa lesión tisular. Se inicia por tanto una inflamación y una respuesta de fase aguda sistémica. El resultado final es bastante parecido al causado por la inyección de LPS aunque las vías iniciales de señalización son diferentes.

La respuesta de fase aguda desencadenada por el LPS y la turpentina es parecida a la que se produce tras una infección o traumatismo. Podríamos definir a la respuesta de fase aguda como la reacción del organismo frente a una variación de la homeostasis debida a una infección, daño tisular, crecimiento neoplásico, desórdenes inmunológicos o estrés. Su objetivo es restaurar la homeostasis. Por tanto podríamos considerarla como un tipo especial de respuesta al estrés. Comienza por la producción de citoquinas proinflamatorias, IL-1, IL-6 y TNF- α por parte de los macrófagos residentes en el lugar de inicio de la reacción. Estas citoquinas actúan sobre el endotelio incrementando la permeabilidad y la presencia de proteínas de adhesión. A su vez pueden activar a otras células convirtiéndolas en productoras de citoquinas y de factores quimiotácticos. Como consecuencia, se produce infiltración del tejido por células inmunes activadas que sintetizan una segunda onda de citoquinas que pueden alcanzar la circulación. Estos mediadores contribuyen a incrementar la respuesta local y pueden conducir a la generalización sistémica de la reacción. Esta fase se caracteriza por incremento de la temperatura corporal, leucocitosis, activación del eje HPA, descenso de la concentración de Zn en suero, y variaciones en la concentración sérica de determinadas proteínas sintetizadas en el hígado (proteínas de fase aguda) (Castell *et al.*, 1990; Heinrich *et al.*, 1990; Baumann and Gauldie, 1994).

Inflamación aguda

El efecto inductor del LPS sobre las MTs hepáticas se conoce desde los trabajos de Sobocinski (Sobocinski *et al.*, 1978). Posteriormente se ha confirmado en varios estudios en ratas tanto a nivel de proteína (Suzuki and Yamamura, 1980; Sobocinski and Canterbury, 1982) como a nivel de mRNA (DiSilvestro and Cousins, 1984b), en ratón (Durnam *et al.*, 1984; Searle *et al.*, 1984) y en hamster (Etzet *et al.*, 1982) entre otras especies. El efecto del LPS no se limita al hígado sino que incrementa los niveles de MT-I+II en suero (Bremner *et al.*, 1987b) y en diversos tejidos del organismo tales como el riñón, páncreas, pulmón, corazón, ovarios, útero, intestino, bazo y cerebro (Searle *et al.*, 1984; De *et al.*, 1990). Por todo esto se ha considerado a las MT-I+II como proteínas de fase aguda. En el cerebro se ha observado que algunas áreas son más sensibles al tratamiento. Las áreas que más responden son la capa de Purkinje del cerebelo y bulbo olfatorio (Itano *et al.*, 1991; Zheng *et al.*, 1995a). Estos resultados han sido confirmados a nivel de proteína, observándose inducción en la M+P y cerebelo (Hernández *et al.*, 1997b; Hernández and Hidalgo, 1998). Parece por tanto que el cerebelo, de manera análoga a lo determinado para el estrés de inmovilización, es el área que más responde al LPS. En los pocos casos en los que se han estudiado, los niveles de MT-III no se ven afectados por el LPS (Palmiter *et al.*, 1992) o tienden a descender en determinadas áreas como el hipocampo (Zheng *et al.*, 1995a).

De manera más o menos paralela a los estudios con LPS, se realizaron experimentos en los que se observó que la administración subcutánea de turpentina induce los niveles hepáticos de MTs en rata (Sobocinski *et al.*, 1981; DiSilvestro and Carlson, 1992). Posteriormente este efecto inductor ha sido observado también en el ratón (Min *et al.*, 1991).

Por tanto aunque el LPS y la turpentina son agentes muy diferentes y su manera de activar el sistema inmunitario difiere entre ellos, ambos son capaces de producir cambios muy similares en la expresión de las MT-I+II.

Está bastante claro que el LPS no tiene capacidad para inducir las MTs en cultivo, ya sea en líneas celulares humanas (Peavy and Fairchild, 1987; Takahashi *et al.*, 1987; Oberbarnscheidt *et al.*, 1988), cultivos primarios de hepatocitos (Abe *et al.*, 1987; Coyle *et al.*, 1995), o en cultivo primario de células gliales de rata (Hidalgo *et al.*, 1994a). En cambio en muchos de los sistemas de cultivo utilizados, que no responden directamente al LPS, si que se produce incremento de la expresión de MT-I y II cuando las células son tratadas con sobrenadantes de macrófagos peritoneales (Abe *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 1987; Coyle *et al.*, 1995) o de linfocitos B (Oberbarnscheidt *et al.*, 1988) estimulados con endotoxina. Queda claro que la inducción de las MT-I y -II por el LPS es dependiente de una reacción orgánica y que muy probablemente sea mediada por una molécula de origen inmunitario liberada al medio. Los candidatos más probables son por tanto las citoquinas. En algunos estudios se ha descartado la IL-1 y los IFNs como posibles mediadores de la inducción (Peavy and Fairchild, 1987). En cambio se ha sugerido a la IL-6 como posible mediador ya que la inducción de las MTs en hepatocitos cultivados por sobrenadantes de macrófagos estimulados con LPS correlaciona muy bien con la inducción causada por esta citoquina (Coyle *et al.*, 1995). La IL-6 es el principal regulador de la fase aguda en el hígado (Castell *et al.*, 1990; Heinrich *et al.*, 1990; Baumann and Gauldie, 1994), por lo que además de ser, presumiblemente, el inductor en cultivo es posible que intervenga en los efectos observados *in vivo*.

El LPS no tiene un efecto puramente local sino que induce una respuesta sistémica, en la que al parecer se engloban las MT-I y -II. Por tanto los posible mediadores de esta respuesta tienen que ser liberados a la circulación para ser efectivos. En un estudio "puente" entre la situación en cultivo y *in vivo* se ha observado que el suero de animales tratados con LPS también es capaz de inducir la síntesis de MT-I y -II en células de hepatoma cultivadas (Itoh *et al.*, 1996). Este efecto es eliminado si el suero lo tratamos con anticuerpos contra la IL-6. Estos resultados claramente implican a esta citoquina como factor regulador de las MTs durante la respuesta de fase aguda. El efecto de la IL-6 es dependiente de la presencia de glucocorticoides en el medio, ya que el tratamiento con RU38486 inhibe totalmente la inducción. Los glucocorticoides también intervienen en la regulación de la respuesta de fase aguda (Baumann and Gauldie, 1994) y la cooperación entre IL-6 y estas hormonas ya se había observado en el control de otras proteínas de fase aguda (Ray *et al.*, 1995). Estos resultados se encuentran en la misma línea que los obtenidos en cultivo de hepatocitos de rata (Schroeder and Cousins, 1990). No obstante esta es una visión reduccionista y es posible que en el animal la situación sea diferente.

Desde un principio se relacionó la inducción de las MTs hepáticas por el tratamiento con LPS o turpentina con el trasvase de Zn desde el suero al hígado. No obstante no se conocía muy bien la posible relación causa-efecto que pudiera existir entre los dos fenómenos. Debido a la capacidad inductora del Zn sobre las MT-I y -II se pensó que quizás el flujo de este

metal fuese el responsable de la regulación de estas proteínas durante la respuesta de fase aguda. En contra de esta hipótesis Durnam y colaboradores demostraron que la síntesis de MT-I y -II precedía al influjo de Zn (Durnam *et al.*, 1984). Finalmente se demostró, mediante el uso de animales KO para estas proteínas (Philcox *et al.*, 1995; Rofe *et al.*, 1996) que la acumulación de Zn en el hígado en respuesta a la administración de LPS era consecuencia de la inducción de MT-I y -II y no al revés.

Debido a que durante la respuesta de fase aguda se induce el eje HPA y los glucocorticoides intervienen en su regulación (Baumann and Gauldie, 1994) se pensó que estas hormonas podrían estar implicadas en la regulación de las MT-I y -II durante la inflamación. No obstante la ADX no afecta a la inducción de las MTs hepáticas por turpentina (Sobocinski *et al.*, 1981) y la hipofisectomía no posee ningún efecto sobre los niveles de mRNA de MT-I y -II tras la administración i.p de LPS (De *et al.*, 1990). Por otro lado el tratamiento con agentes bloqueantes de los receptores para las catecolaminas tampoco inhibe la inducción de las MTs hepáticas por turpentina (Brady *et al.*, 1987). Utilizando una aproximación molecular, se observó que la inducción por LPS era independiente del control del promotor de las MTs por los glucocorticoides (Durnam *et al.*, 1984). En conjunto estos resultados sugieren que las principales hormonas de la glándula adrenal no son necesarias para producir un incremento de la síntesis de MT-I y -II durante la respuesta de fase aguda, contrariamente a lo que ocurre en cultivo. No obstante como ya se ha comentado la situación en cultivo e *in vivo* no son directamente comparables.

Por otra parte, el pretratamiento con dexametasona previamente a la administración de turpentina o LPS causa un descenso considerable de la acumulación hepática de MTs (Min *et al.*, 1992). Este efecto se atribuye a la propiedad antiinflamatoria de los glucocorticoides que inhiben la producción de citoquinas (Nishida *et al.*, 1989; Falus *et al.*, 1995). Estos autores, concluyen que *in vivo*, las citoquinas, principales mediadores inflamatorios, serían los responsables de la inducción de las MT-I y -II por LPS. Los primeros datos que implicaron directamente a estos mediadores intercelulares en el control de las MTs hepáticas fueron obtenidos en los ratones C3H/Hej. Estos animales presentan una mutación en el gen *lps* como consecuencia de la cual producen una cantidad menor de citoquinas frente a estímulos que normalmente incrementan su producción, como es la administración de LPS (Vogel, 1992). Tras la administración de LPS estos animales presentan unos niveles hepáticos de MTs claramente inferiores a los cuantificados en los ratones controles (Maitani *et al.*, 1986; De *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991). Este efecto sería debido a la disminución en la producción de citoquinas puesto que la administración directa de citoquinas proinflamatorias sí que induce la expresión de MT-I y -II en esta cepa de ratones (De *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991).

Inflamación crónica

A nivel del SNC, en nuestro laboratorio hemos utilizado otro modelo de inflamación, en este caso crónica. Se trata de los ratones GFAP-IL-6. Los ratones GFAP-IL6 son unos animales transgénicos que expresan constitutivamente el gen de la IL-6 en astrocitos debido a

que la región codificante para esta citoquina se ha puesto bajo control transcripcional del promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (figura 6). En estos animales se observa una inflamación crónica progresiva neural acompañada de una respuesta de fase aguda. Además, presentan de manera secundaria sobreexpresión de moléculas de adhesión (ICAM-1) y citoquinas (IL-1 y TNF- α), alteraciones en la barrera hematoencefálica y una marcada angiogénesis (Campbell *et al.*, 1993; Chiang *et al.*, 1994; Brett *et al.*, 1995; Campbell and Chiang, 1995; Barnum *et al.*, 1996; Campbell, 1998). Todas estas alteraciones conducen a: i) una marcada neurodegeneración en la corteza, hipocampo y sobretodo en el cerebelo (Campbell *et al.*, 1993; Campbell, 1995), ii) registros electroencefalográficos anormales (Steffensen *et al.*, 1994), iii) incremento de la actividad del eje HPA (Raber *et al.*, 1997), y iv) déficits de memoria y aprendizaje (Heyser *et al.*, 1997). En conjunto, presentan un cuadro crónico muy similar a determinadas enfermedades neurodegenerativas humanas, como la afectación neural del HIV, la AD, el síndrome de Creutzfeldt-Jakob o el *scrapie* (Campbell, 1995; Campbell and Chiang, 1995; Campbell, 1998).

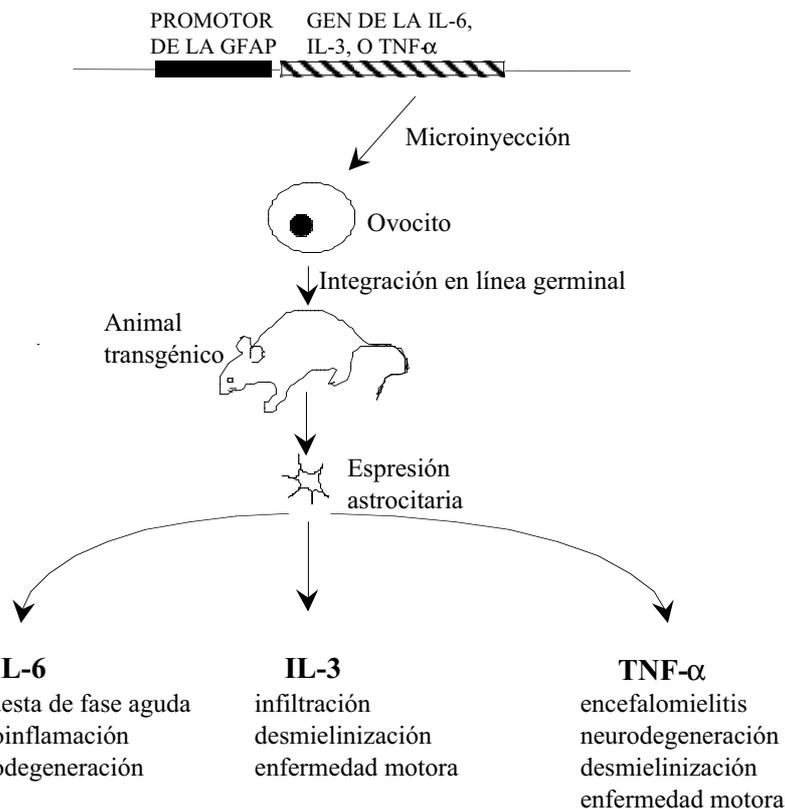


Figura 5. Fusionando el gen de una citoquina al promotor de la GFAP (proteína de expresión predominantemente astrocitaria) se consigue sobreexpresar la citoquina bajo estudio en astrocitos. Dependiendo de la citoquina utilizada los animales resultantes presentan distintos fenotipos que se resumen en la parte inferior de la figura.

Los animales GFAP-IL6 constituyen un modelo ideal para el estudio de la regulación de las MTs cerebrales en una situación de inflamación crónica. Estos animales presentan síntomas de sufrir una respuesta de fase aguda a nivel central que es más patente en aquellos

lugares en los que se produce deterioro del tejido, a saber: cerebelo, M+P, y tálamo. La expresión de MT-I+II está drásticamente incrementada en estos animales y su nivel de expresión se correlaciona con las zonas donde se expresa la construcción transgénica. Por el contrario, la expresión de la MT-III, determinada por *Northern blot*, no está muy afectada y en todo caso tiende a descender sus niveles, en consonancia con lo observado en modelos de inflamación aguda. Estos resultados parecen indicar que la IL-6 regula las MT-I y -II en situación de inflamación crónica del SNC (Hernández *et al.*, 1997b). No obstante parece muy difícil delimitar el efecto del producto transgénico directamente de la inducción secundaria que puede producirse como consecuencia de la inflamación y daño tisular causado. En esta tesis se amplían estos resultados mediante el estudio por hibridación *in situ* de la expresión de la MT-I y MT-III, lo que nos ha permitido diseccionar con mayor claridad el efecto de la sobreexpresión de la IL-6 sobre estas proteínas.

3.3.6 Estrés oxidativo

El oxígeno es una sustancia esencial para los organismos con metabolismo aeróbico. No obstante algunos derivados de esta molécula, debido a su alta reactividad, son muy perjudiciales para la vida. Son las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se producen continuamente en nuestras células como consecuencia, principalmente, de la actividad mitocondrial. Entre ellas destacan por su importancia en los sistemas vivos el ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), y el radical hidroxilo ($HO\cdot$). Ambas moléculas son radicales libres, aunque también existen otros derivados del oxígeno no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que debido a su descomposición en $HO\cdot$ pueden resultar perniciosos.

Entendemos por radical libre aquella molécula de vida independiente que presenta uno o más electrones desapareados. Como consecuencia de esta estructura atómica generalmente son moléculas con una elevada reactividad. En los seres vivos encontramos además de los ROS otros radicales libres como derivados de los tioles o de bases nitrogenadas (ej. $NAD\cdot$) que se producen como consecuencia del metabolismo celular, y derivados de xenobióticos que por determinadas razones pueden acumularse en el organismo (ej. $CCl_3^{\cdot+}$). No obstante los más importantes son los ROS debido a su mayor abundancia y reactividad. Además un incremento de los demás radicales suele desembocar en la acumulación de ROS. Los ROS, especialmente el hidroxilo son moléculas promiscuas en el sentido que reaccionan muy rápidamente con gran cantidad de especies químicas distintas. En el entorno celular, las moléculas atacadas, pueden ser proteínas, ácidos nucleicos o ácidos grasos que pueden ver alterada su estructura molecular y su función. Dentro de los ácidos grasos son especialmente sensibles los poliinsaturados (PUFA). Como consecuencia de la reacción con un radical libre, la molécula con la que interacciona puede perder o ganar electrones convirtiéndose a su vez en un radical lo cual puede conducir a una reacción en cadena como la peroxidación lipídica.

En condiciones normales el organismo tiene defensas frente a los ROS que los mantienen en niveles tolerados por la célula. Estas defensas engloban mecanismos enzimáticos específicos y moléculas más inespecíficas que actúan como secuestradoras de

radicales libres. Entre los enzimas específicos encontramos las superóxido dismutasas (SOD) que catalizan la dismutación del superóxido en peróxido de hidrógeno, posteriormente la catalasa y las peroxidases catalizan el paso de H_2O_2 a H_2O y oxígeno. No obstante no existe ninguna defensa específica frente al radical hidroxilo, que es el más peligroso debido a su alta inestabilidad. Entre las defensas inespecíficas encontramos moléculas pequeñas que debido a sus características químicas reaccionan con gran afinidad con los radicales libres impidiendo que ataquen a otros componentes celulares. Son los denominados *scavengers* o secuestradores. Entre ellos destacan el glutatión (GSH) y algunas vitaminas (Vitaminas C,D,E). Cuando entran en contacto con los radicales se oxidan y posteriormente pueden ser regenerados por sistemas enzimáticos.

Bajo ciertas circunstancias el equilibrio entre radicales libres y capacidad protectora de las defensas puede alterarse bien por fallo de estas últimas o incremento de la producción de radicales. Como consecuencia los radicales libres pueden suponer un peligro para la integridad celular causando daños a enzimas, mutaciones y roturas en el DNA o comprometiendo la integridad de las membranas. A esta situación la denominamos estrés oxidativo. Algunas consecuencias del estrés oxidativo como la peroxidación lipídica o la nitrosilación de proteínas se utilizan como marcadores de esta condición estresante.

Muchos de los tratamientos que inducen la síntesis de las MTs provocan estrés oxidativo asociado por diversas vías: producción de ROS (ej. *tert*-butilhidroquinona; tBHQ), por actuación a través de ciclos redox (paracuat, adriamicina), aumentando la peroxidación lipídica (cisplatina) o consumiendo los niveles de glutatión (dietil maleato). Además, durante el estrés por inmovilización y la inflamación se produce estrés oxidativo asociado (Sato and Bremner, 1993).

Debido a esto se ha especulado que los peróxidos o los radicales libres podrían participar en la inducción de las MTs en las situaciones mencionadas más arriba. De hecho, en el caso concreto del estrés por inmovilización se ha observado que el pretratamiento con vitamina E, un conocido antioxidante, consigue reducir el incremento de la síntesis de las MTs hepáticas durante el estrés (Hidalgo *et al.*, 1988a).

Esta hipótesis se ve reforzada por la inducción de las MT-I y -II en cultivos de líneas celulares de hepatoma de roedores (Hepa cell) (Dalton *et al.*, 1994) y cultivos hipocampales (Scortegagna *et al.*, 1998) directamente por agentes que incrementan la producción de radicales libres como el peróxido de hidrógeno y la tBHQ. Por ello se ha pensado que podrían actuar a través de factores de transcripción que responden directamente a estrés oxidativo o a vías señalizadoras activadas por los radicales libres. En respuesta a estas sustancias se activa el USF que se une al ARE situado en el promotor de la MT-I (Dalton *et al.*, 1994). Estudios posteriores han demostrado que en la inducción de la MT-I por el peróxido de hidrógeno, tBHQ y estrés oxidativo en general, podrían estar implicados los MREs y su factor en *trans*, el MTF-1 (Dalton *et al.*, 1996).

4. Funciones de las MTs

Como ya hemos visto las MTs están presentes en toda la escala evolutiva, se distribuyen en prácticamente todas las células del organismo y su expresión está activamente regulada por varios sistemas de control durante el desarrollo y en la vida adulta. Estas características sugieren que las MTs pueden jugar un papel funcional importante, quizás esencial en el conjunto del organismo, puesto que es evidente que ha debido existir una presión evolutiva para que perdurasen durante la evolución.

A pesar de los numerosos esfuerzos realizados, la/s función/es que desempeñan las MTs no han sido dilucidadas en los 40 años transcurridos desde su descubrimiento. Se han propuesto numerosas funciones en las que podrían participar, aunque hasta la fecha ninguna de ellas es plenamente satisfactoria. Las hipótesis se han basado en sus características químicas de politiol, su gran afinidad por los metales pesados y su alta inducción por diversos tratamientos. Se trata por tanto de datos circunstanciales que no han aportado conclusiones definitivas.

En un *minireview* del 85 (Karin, 1985), Karin apuntaba las posibles funciones de estas proteínas: i) proteínas detoxificadoras de metales pesados y xenobióticos, ii) reguladoras de la homeostasia de metales pesados y iii) antioxidantes celulares. Desde entonces hasta nuestros días se ha intensificado el esfuerzo investigador destinado a desvelar los procesos vitales en los que intervienen las MTs. No obstante las ideas principales expuestas en ese trabajo siguen vigentes actualmente. Ultimamente se ha conseguido un gran avance cualitativo con la creación de cepas de ratones KOs para las MTs. Se ha podido así matizar las especulaciones basadas en investigaciones previas e iniciar nuevas líneas de trabajo.

4.1 Funciones relacionadas con los metales

La relación existente entre los metales pesados y las MTs es evidente. Los metales controlan la expresión de estas proteínas y forman parte de su estructura. Por tanto muchas de las funciones propuestas para las MTs giran en torno a su interacción con el Zn, Cu y otros metales ambientales.

4.1.1 Detoxificadoras

Se ha propuesto que las MTs funcionen como detoxificadoras o protectoras frente a excesos de metales pesados en el ambiente, como podrían ser el Zn, Cu, Cd, Hg, Pb etc. Entre ellos figuran metales no fisiológicos, altamente tóxicos, como el Cd y el Hg. Otros como el Cu y Zn se encuentran normalmente en el organismo aunque potencialmente podrían ser perniciosos a altas concentraciones, especialmente el primero. Esta idea se apoya en el aumento de los niveles de MT-I y -II, ya sea por amplificación génica o inducción de la transcripción, como consecuencia de un incremento de la concentración de metales pesados en el medio y en su capacidad para unirlos evitando así que interaccionen con otros componentes celulares.

En cultivo queda claro que las MT-I y -II podrían tener un papel protector. Se ha observado que líneas celulares que carecen de MTs son sensibles a concentraciones de Cd en el medio de cultivo que son inocuas para células normales (Compere and Palmiter, 1981). Por el contrario, se han generado células que sobreexpresan MTs que son más resistentes al Cd (Karin *et al.*, 1983). En las células *baby hamster kidney cells* (BHK), que no sintetizan MTs, la transformación con genes tanto de MT-I como de MT-III causa una mayor tolerancia a Cd, Zn y Cu (Palmiter, 1995). De manera análoga, la preinducción de las MTs mediante Zn en cultivos de levadura (Ecker *et al.*, 1986) y en hepatocitos (Frazier and Din, 1987; Liu *et al.*, 1990) tiene como consecuencia una mayor resistencia al Cd. A nivel bioquímico el Cd puede afectar a múltiples procesos celulares. Por ejemplo, inhibe la polimerización de la actina e inhibe la actividad de múltiples enzimas, entre ellas la carboxipeptidasa. *In vitro* la adición de Zn-MT revierte los efectos tóxicos del Cd sobre la actina y la carboxipeptidasa (Jamall and Smith, 1985; Huang, 1993).

Se cree que esta protección también sería extensible al animal *in vivo*. En este sentido los animales KO para las MT-I y -II (MTKOs) son más sensibles a la administración i.p y en la bebida de Cd que los animales controles (Masters *et al.*, 1994a). Por el contrario los ratones que sobreexpresan estas proteínas toleran cantidades de Cd superiores (Iszard *et al.*, 1995b). Parece existir un claro efecto protector al menos a nivel agudo. No obstante se duda de su eficacia como detoxificador a largo plazo puesto que las MTs, aunque se encuentran en el suero y en la bilis, no son secretadas en cantidades significativas y por tanto no se consiguen eliminar los metales pesados del organismo.

Una de las principales alteraciones sistémicas causadas por el Cd es su nefrotoxicidad. Este efecto se detecta también cuando se administra Cd-MT al animal (Cherian and Clarkson, 1976; Squibb and Fowler, 1984; Squibb *et al.*, 1984). Se piensa que la nefropatía causada por el Cd podría ser mediada por la filtración del complejo Cd-MT por el glomérulo renal y posterior reabsorción en el túbulo proximal. La Cd-MT sería englobada en los lisosomas donde se acumularía. Posteriormente la parte proteica sería degradada liberándose el Cd que causaría los efectos tóxicos (Nordberg and Nordberg, 1987a; Nordberg and Nordberg, 1987b). No obstante en los animales MTKO tras la administración de Cd también se producen lesiones en el riñón por lo que está claro que las MT-I y -II no son los responsables de este efecto (Klaassen and Liu, 1997).

De todas maneras no es probable que la detoxificación de metales pesados sea el papel primario de las MTs. En primer lugar la unión del Cd a estas proteínas probablemente sea un hecho circunstancial debido al gran parecido químico entre este metal y el Zn (Bremner and Beattie, 1990; Vallee and Maret, 1993). Además las concentraciones del Cd en la naturaleza son extremadamente bajas, a excepción de determinadas zonas industriales, y por tanto no suponen ningún peligro para la salud general. Por otra parte la acumulación de Zn puede ser tóxica para determinadas células en cultivo o *in vivo* pero la administración de cantidades no fisiológicas de Zn no causa problemas sistémicos y por tanto no suele comprometer la viabilidad del individuo. En definitiva, podemos suponer que los metales

pesados no han podido ejercer una presión evolutiva lo suficientemente fuerte como para justificar la conservación de las MTs durante la evolución. Por tanto no es razonable pensar que las MTs aparecieron y se han conservado durante la evolución para anticipar los problemas de la industrialización (Vallee and Maret, 1993; Vallee, 1995). Es posible que la detoxificación sea un efecto secundario y no la función primaria de estas proteínas.

4.1.2 Homeostasis

Debido a sus características se acepta generalmente que las MTs participarían en la homeostasis de metales pesados como el Zn y el Cu aunque no se conocen los mecanismos concretos. Estos metales aunque son fisiológicos cuando se encuentran a elevadas concentraciones pueden resultar tóxicos. Una de las propuesta supone que podrían evitar los efectos perniciosos del exceso de Zn y/o Cu manteniéndolos en forma no tóxica. El exceso de Zn y Cu se podría acumular junto con las MTs en forma de agregados insolubles en los lisosomas (Bremner, 1991; Cherian and Chan, 1993). De esta manera las MTs podrían contribuir a mantener la concentración del Cu y el Zn dentro de un rango fisiológico.

También podrían participar en otros procesos homeostáticos del Cu y el Zn. En este sentido se ha propuesto que jugarían un papel en la absorción (Cousins, 1985), transporte (Nordberg and Nordberg, 1987b) y excreción de metales (Cousins, 1985). Podrían regular la concentración disponible de Zn y Cu en un momento determinado en cada tejido.

Respecto a la absorción, se ha observado en rata un incremento de las concentraciones intestinales de MT-I y -II de manera paralela a las de Zn en la dieta (Richards and Cousins, 1976). La eficacia de absorción del Zn mantiene una relación inversa con la disponibilidad de este metal en la dieta y por tanto también con la concentración intestinal de MTs (Richards and Cousins, 1976). Debido a esto se especuló que las MTs regularían la absorción de Zn limitando su paso a la circulación (Hall *et al.*, 1979).

No obstante no existe un consenso respecto a este papel. En otros animales como el ratón no se ha observado la relación inversa entre disponibilidad de Zn y MTs intestinales (Starcher *et al.*, 1980; Flanagan *et al.*, 1983). Otros autores consideran que estas proteínas podrían jugar un papel permisivo en la absorción de Zn (Starcher *et al.*, 1980). Por otra parte la variación de los niveles de MTs intestinales sólo se observa con concentraciones extremas de Zn en la dieta, muy alejados de las cantidades normales (Blalock *et al.*, 1988; Cherian and Chan, 1993) y podrían simplemente reflejar la concentración de Zn intracelular. En el caso del Cu el panorama es más complicado puesto que no se ha encontrado ninguna relación entre su disponibilidad en la dieta y la concentración intestinal de MTs (Hall *et al.*, 1979; Blalock *et al.*, 1988).

Los animales MTKO no presentan alteraciones graves de los niveles de Cu y Zn, sugiriendo que las MTs no son esenciales para la captación o excreción de los mismos (Masters *et al.*, 1994a). Aunque en condiciones normales no se detecten efectos importantes de la deficiencia de MTs, estas proteínas podrían ser relevantes bajo ciertas circunstancias como el déficit de algún sistema de transporte. En concreto se ha observado que células de

animales MTKOs a las que se les ha inactivado el transportador de Zn son más sensibles a este metal (Palmiter, 1999). Respecto al Cu, se ha testado el posible papel de las MT-I y -II en los ratones MO-brJ que son un modelo de la enfermedad de Wilson. Estos animales poseen una mutación cuya consecuencia es la producción de Cu-ATP7Aasa (transportador de membrana de Cu) defectuosas. Se han desarrollado animales que poseen esta mutación y que simultáneamente son KO para las MT-I y -II. La viabilidad de estos animales es mucho menor que la de sus controles. Por tanto las MT-I y -II podrían intervenir en la homeostasis del Cu, al menos en ciertas circunstancias (Kelly and Palmiter, 1996).

4.1.3 Reservorio /donadoras

Otra de las propuestas es considerar las MTs como reservorios de Zn o Cu. No obstante no parece probable que intervengan en el almacenaje a largo plazo de estos metales puesto que su vida media es relativamente corta (Bremner, 1991) y su unión al Zn es lábil (Otvos *et al.*, 1987). Además debemos añadir que su unión a los metales es dinámica y se ha demostrado intercambio tanto inter como intramolecular de átomos metálicos en dímeros de MTs (Kägi, 1993). Por tanto parecen más adecuadas para constituir un *pool* dinámico de Zn que proporcione este metal en determinadas condiciones a los constituyentes celulares que lo necesiten en cada caso.

In vitro se ha observado que pueden intercambiar metales con varias apoproteínas. En algunos casos la liberación de Zn ocurre a mayor velocidad que la degradación de las MTs (Krezoski *et al.*, 1988) sugiriendo que este fenómeno se encuentra regulado. Entre las proteínas que pueden intercambiar metales con las MTs se encuentran enzimas y factores de transcripción. Las formas apo de la SOD y la fosfatasa alcalina son capaces de sustraer metales de las MT-I y -II lo que conduce a su activación (Udom and Brady, 1980; Geller and Winge, 1982; Krezoski *et al.*, 1988). Por otro lado las tioneínas podría secuestrar metales de otras proteínas como los factores de transcripción Sp1 y TFIIIA inhibiendo su unión a DNA (Zeng *et al.*, 1991a; Zeng *et al.*, 1991b).

In vivo existen datos experimentales que indican que las MT-I y -II podrían competir por el Zn con otras proteínas como el receptor de los glucocorticoides afectando así a su actividad (Koropatnick *et al.*, 1999). Por todos estos datos se ha propuesto que las MTs podrían formar un par regulador con la tioneína de manera similar al glutatión con el glutatión reducido (Vallee, 1995). Mediante la transferencia de metales el par MT/T podría intervenir en multitud de procesos enzimáticos, la transcripción o la apoptosis (Cherian *et al.*, 1999). Este mecanismo de activación/desactivación debería estar regulado en la célula. *In vitro* se ha desarrollado un modelo que sugiere que la cesión de los metales podría estar acoplada al estado redox de la célula y por tanto a vías de transmisión de señales (Maret, 1994; Maret, 1995). De esta manera durante situaciones estresantes en las cuales se altera el equilibrio oxidativo y la disponibilidad de Zn puede ser un factor limitante, las MTs podrían jugar un papel importante en la regulación de determinados procesos celulares.

No se ha demostrado que *in vivo* se produzcan reacciones de transferencia de metales que impliquen a las MTs más allá de la simple competencia. Además tampoco existe constancia experimental de la presencia de un *pool* de tioneínas en la célula que soporte la idea del par MT/T. Por otra parte los animales MTKO no presentan ninguna alteración en la síntesis de metaloproteínas y son perfectamente viables bajo condiciones estándares de laboratorio. Esto sugiere que las MT-I y -II no serían necesarias para la actividad de ninguna enzima esencial. No obstante en situaciones de deficiencia de Zn se ha observado que los animales MTKO presentan un menor número de gestaciones que los animales controles y las pocas crías que se obtienen mueren a los pocos días. Estos resultados indican que las MTs podrían jugar un importante papel en situaciones en las que el Zn es limitante (Rofe *et al.*, 1999).

4.2 Antioxidantes

El organismo posee defensas frente los radicales libres que pueden incrementarse durante situaciones de estrés oxidativo en un intento por equilibrar la situación o ponerse en marcha otra serie de mecanismos de emergencia. Estos pueden ser defensas adicionales, mecanismos de reparación o pueden iniciar procesos como la apoptosis para evitar daños mayores al conjunto del organismo. Se ha propuesto que las MTs podrían intervenir en esta respuesta de emergencia frente al estrés oxidativo (Sato and Bremner, 1993).

Las MTs son buenas candidatas a participar en la defensa frente al estrés oxidativo por varias razones. En primer lugar estas proteínas tienen un gran número de tioles en su estructura. Este grupo químico es muy neutrófilo por lo que puede reaccionar con mucha afinidad con radicales electrófilos como los ROS (Kägi, 1993; Vallee and Maret, 1993; Vallee, 1995). Por otra parte, como ya he comentado, las MT-I y -II se inducen en multitud de situaciones en las que se generan radicales libres como el estrés por inmovilización (Hidalgo *et al.*, 1988a), la inflamación (Sobocinski and Canterbury, 1982), la irradiación (Shiraishi *et al.*, 1986), o por la administración directa de formadores de radicales como el H₂O₂ (Dalton *et al.*, 1994) o el CCl₄ (Oh *et al.*, 1978).

In vitro se ha observado que la MT-I es capaz de interaccionar con el radical hidroxilo y en menor medida con el ion superóxido causados por la actividad de la xantina oxidasa. La afinidad con que reacciona con el hidroxilo es superior a la de cualquier otra molécula biológica conocida por lo que se pensó que su función podría ser la de proteger a la célula frente a este radical (Thornalley and Vasák, 1985). La interacción se realizaría directamente con los grupos tioles al ser desplazados los metales. La capacidad de secuestrar ROS por las MTs se refleja en un efecto protector, al menos *in vitro*, frente al daño causado por los radicales producidos por la actividad de la xantina oxidasa al DNA (Abel and de Ruiter, 1989), o a las membranas (Thomas *et al.*, 1986). Las MT-I y -II también son capaces de proteger *in vitro* de los efectos de la irradiación con rayos-X (Greenstock *et al.*, 1987). En algunos casos se ha demostrado que su efecto protector es muy superior al conseguido por cantidades idénticas de glutatión (Abel and de Ruiter, 1989). Además de su posible acción como *scavenger*, se ha observado que *in*

vitro la Cu-MT aceleraría la dismutación del superóxido, siendo esta actividad catalítica totalmente dependiente de la presencia de Cu en su molécula (Shiraishi *et al.*, 1982). Por tanto los posibles efectos protectores de las MT-I y -II podrían ser consecuencia tanto de las características de su porción peptídica como por su contenido metálico.

Se ha sugerido que esta capacidad antioxidante de las MT-I y -II podría ser aprovechada por la célula como mecanismo protector frente a situaciones de estrés oxidativo. En varios estudios se ha observado que líneas celulares resistentes al tratamiento con rayos X presentaban niveles de MT-I y -II superiores a los cuantificados en las células de las cuales procedían (Bakka *et al.*, 1982). Después de estos trabajos se han realizado otros en diversos tipos celulares en los cuales el incremento de la síntesis de las MTs, ya sea por inducción de la transcripción o por aumento de la dosis génica, tiene como consecuencia una menor sensibilidad a los radicales libres. Así, en hepatocitos cultivados tratados con Zn se produce una menor acumulación de radicales libres y menor peroxidación lipídica tras suministrar agentes prooxidantes al cultivo (Coppens *et al.*, 1988). El aumento de la dosis génica mediante selección de la resistencia a Cd en cultivos de células de hámster causa una menor sensibilidad a los radicales libres producidos por la acción de la xantina oxidasa (Mello-Filho *et al.*, 1988). No obstante en estos modelos experimentales los efectos protectores podrían ser debidos no sólo al incremento de las MTs sino consecuencia del metal utilizado para inducirlos o a otros factores seleccionados conjuntamente con las MTs. En este sentido un estudio ha demostrado que el incremento de la resistencia a Cd causaba un aumento de la concentración de MTs y GSH en el cultivo y que solamente la concentración de este último se correlacionaba con la resistencia a peróxido de hidrógeno (Chubatsu *et al.*, 1992). Por otra parte, la sobreexpresión de MTs en células cardíacas (Wang *et al.*, 1999) y en líneas celulares NIH 3T3 (Schwarz *et al.*, 1994) provoca una mayor resistencia a agentes productores de radicales libres, mientras que las células procedentes de animales KOs para MT-I y -II, ya sean embrionarias (Lazo *et al.*, 1995) o hepatocitos (Zheng *et al.*, 1996), han demostrado ser más sensibles a tratamientos que provocan estrés oxidativo. Estos resultados, en conjunto, demuestran claramente que las MT-I y -II son antioxidantes celulares eficaces.

In vivo también se ha constatado el efecto protector de las MT-I y -II frente al estrés oxidativo. La preinducción mediante metales causa una mayor supervivencia a irradiación por rayos-X (Matsubara *et al.*, 1986; Matsubara, 1987; Matsubara *et al.*, 1987b), inhibe la peroxidación lipídica producida por el estrés de inmovilización (Hidalgo *et al.*, 1988a), paracuato (Satoh *et al.*, 1992) o drogas como la adriamicina (Naganuma *et al.*, 1988; Satoh *et al.*, 1988a). En este caso los efectos no pueden ser atribuidos al Zn puesto que se observan también cuando se inducen las MTs con otros metales como Bi, o Cd (Matsubara *et al.*, 1987a; Matsubara, 1988; Naganuma *et al.*, 1988; Satoh *et al.*, 1988b; Satoh *et al.*, 1988a). De manera análoga la administración vía sanguínea de MTs protege frente al daño oxidativo causado en el corazón por isquemia/reperfusión (Minamide *et al.*, 1999).

Recientemente gracias a los animales transgénicos que sobreexpresan MT-I y -II y los animales KOs permanecen pocas dudas acerca de su participación en la defensa contra los

radicales libres. Así, se ha observado que los animales transgénicos que sobreexpresan estas proteínas sufren menor daño cardíaco tras el tratamiento con doxirubicina (Kang *et al.*, 1997) o después de isquemia/reperfusión (Kang, 1999). Por el contrario los animales KO son más susceptibles al Hg, cisplatina paracuato y acetaminopteno (tratamientos que provocan estrés oxidativo), en términos de peroxidación lipídica y daño renal (Sato *et al.*, 1996a; Liu *et al.*, 1999; Satoh and Tohyama, 1999), y al daño causado a la médula ósea por la irradiación (Satoh and Tohyama, 1999).

Está comunmente aceptada la participación de las MT-I y -II como antioxidantes aunque no se sabe con certeza como realizarían esta función. Algunos autores opinan que podrían actuar directamente como *scavengers* de manera análoga al glutatión (Thornalley and Vasák, 1985). Por el contrario otros autores consideran que la acción podría ser ejercida principalmente por los metales liberados (Thomas *et al.*, 1986), fundamentalmente el Zn. El Zn podría estabilizar las membranas y proteger frente la peroxidación lipídica (Chvapil *et al.*, 1972) o inhibir determinados sistemas enzimáticos que pueden actuar como fuente de radicales (Coppen *et al.*, 1988). Una de las fuentes principales de radical hidroxilo es la reacción de Fenton mediante la cual el peróxido de hidrógeno se descompone en radical hidroxilo e ion hidroxilo. Esta reacción está catalizada por Fe^{2+} . Las MT-I y -II podrían inhibir esta reacción y por tanto disminuir el estrés oxidativo quelando este metal (Sato and Bremner, 1993). Finalmente se ha propuesto que las MT-I y -II actuaran como donadores de protones reparando así el daño causado por el estrés oxidativo a determinadas estructuras como el DNA (Greenstock *et al.*, 1987).

4.3 Efectos sobre proliferación, crecimiento y activación celular. Implicaciones sobre el sistema inmunitario.

Las MT-I y -II son proteínas que varían su expresión y localización durante el desarrollo embrionario (Cherian and Chan, 1993). En términos generales su expresión es máxima en los periodos perinatales y se encuentran tanto en el citosol como en la fracción particulada durante este periodo. Sin embargo, posteriormente en las células diferenciadas del animal adulto predomina la localización citosólica (Cherian and Banerjee, 1991; Cherian, 1994; Cherian *et al.*, 1999). Es decir existe cierto paralelismo entre la localización nuclear de las MT-I y -II y proliferación activa. Esta relación y que sus genes sean inducibles por hormonas y citoquinas ha dado pie a pensar que podrían intervenir en procesos de proliferación, diferenciación y maduración (Webb, 1987; Cherian and Chan, 1993).

Al igual que durante el desarrollo, en la vida adulta se producen importantes cambios en la expresión de las MT-I y -II que podrían estar relacionados con la proliferación. Se ha observado que estas proteínas incrementan sus niveles tras la extirpación parcial del hígado, coincidiendo con el periodo de división celular que se produce (Webb, 1987; Tohyama *et al.*, 1993; Tsujikawa *et al.*, 1994). La expresión de estas proteínas es elevada en tejidos con alta tasa proliferativa como túbulos seminíferos (Nishimura *et al.*, 1990; Tohyama *et al.*, 1994), el folículo piloso (Nishimura *et al.*, 1999) y en epidermis (Karasawa *et al.*, 1991); células

transformadas con gran tasa de división (Waalkes and Goering, 1990; Cherian and Chan, 1993; Cherian *et al.*, 1993) y en tumores de células indiferenciadas (Cherian and Chan, 1993; Cherian *et al.*, 1993) (Cherian *et al.*, 1999).

Bajo estímulos que inducen la proliferación se produce una translocación de las MT-I y -II hacia el núcleo (Nishimura *et al.*, 1989; Cherian, 1994; Tsujikawa *et al.*, 1994), específicamente en determinadas fases del ciclo celular, desde la fase S hasta G₂M (Tsujikawa *et al.*, 1994; Levadoux *et al.*, 1999). Este fenómeno no es inespecífico puesto que otros tratamientos como el Zn que incrementan la expresión de las MT-I y -II no tienen como consecuencia la aparición nuclear de estas proteínas. La translocación al núcleo puede ser inducida por el tratamiento con factores de crecimiento (Tsujikawa *et al.*, 1994) y es inhibida por inhibidores de la tirosina quinasa por lo que se piensa que debe de existir un mecanismo específico; aunque hasta el momento no se conoce (Tsujikawa *et al.*, 1993).

El significado exacto de su localización nuclear se desconoce. Se ha propuesto que podría proteger al DNA frente al daño oxidativo o intervenir en procesos de transferencia de metales. De cualquier manera tanto las MTs citoplasmáticas como las nucleares podrían intervenir indirectamente en procesos de proliferación y diferenciación. En la célula existen múltiples proteínas que necesitan el Zn como cofactor, entre ellas factores de transcripción, fosfatasa, enzimas que intervienen en la transcripción o en la apoptosis. Las MTs podrían influir en estos procesos quelando o donando los metales necesarios. Además el crecimiento y la diferenciación celular se pueden ver afectados por la producción de radicales libres (Cherian *et al.*, 1999).

Es de especial importancia desde el punto de vista de esta tesis, el posible efecto de las MTs sobre la proliferación de las células del sistema inmunitario. La expresión de las MT-I y -II es abundante en fibroblastos de tejidos infiltrados (granulados) de úlceras crónicas humanas. Por ello se ha propuesto que quizás fuesen importantes para el crecimiento del tejido granular o como protectoras frente al exceso de producción de ROS (Douglas-Jones *et al.*, 1992). En apoyo de esta idea, la administración de MT-I y -II a cultivos de linfocitos causa proliferación de células B tanto en presencia como en ausencia de mutágeno (Lynes *et al.*, 1990).

Los efectos de las MT-I y -II sobre células inmunes no se limitan a la proliferación, sino que pueden actuar también sobre la activación, adherencia e invasividad de macrófagos. Se han observado efectos atribuibles a la presencia de MT-I y -II intracelulares o extracelulares. Cuando estas proteínas son administradas a cultivos de macrófagos estimulan su activación. En concreto, los macrófagos tratados con MT-I y -II producen más peróxido de hidrógeno y digieren más eficazmente las sustancias fagocitadas (Youn *et al.*, 1995). Por el contrario la introducción de RNA antisentido para la MT-I en macrófagos cultivados produce una menor tasa de síntesis de H₂O₂, y menor adherencia e invasividad de estas células tras ser estimuladas por LPS (Leibbrandt *et al.*, 1994).

In vivo se ha determinado que su papel podría afectar globalmente a la respuesta inmunitaria del individuo. Cuando se administran exógenamente tienen un marcado efecto

antiinflamatorio (Miesel *et al.*, 1990) e impiden la formación de úlcera gástrica inducida por etanol o estrés (Mimura *et al.*, 1988). De manera similar son capaces de afectar a la inmunidad específica humoral. Cuando son administradas conjuntamente con ovoalbúmina de otra especie causan un descenso de la producción de anticuerpos específicos frente al antígeno suministrado. Esta inhibición parece ser específica puesto que la producción de IgG globales no se ve afectada (Lynes *et al.*, 1993; Lynes *et al.*, 1999). Debido a esto se ha propuesto que podrían ser proteínas inmunomoduladoras.

Al menos parte de los efectos de las MT-I y -II sobre las células inmunitarias parecen mediados por unión de estas proteínas a la membrana plasmática (Youn *et al.*, 1995; Borghesi *et al.*, 1996). Se ha sugerido que la interacción entre estas proteínas y la membrana de las células inmunes causaría la activación de vías de transmisión de señales que afectarían al comportamiento de las células. Esto implica que las MT-I y -II tendrían que ser liberadas al medio. Puesto que no siguen una ruta normal de secreción, podrían ser secretadas por mecanismos específicos o ser liberadas como consecuencia de un proceso de muerte celular. En cualquiera de los casos las MT-I y -II tendrían la oportunidad de ejercer efectos extracelulares. En este sentido se ha detectado que las MT-I y -II podrían unirse a factores celulares aún por determinar (Gasull and Hidalgo, 1996) e incluso unirse a membranas de linfocitos (Borghesi *et al.*, 1996), macrófagos (Youn *et al.*, 1995), células endoteliales (Cheng *et al.*, 1999) y astrocitos (El Refaey *et al.*, 1997). No obstante, las MTs no necesariamente tendrían que ser liberadas para poder influir sobre el sistema inmunitario puesto que se encuentran en células de este sistema y otras como los astrocitos y microglia que en momentos puntuales pueden participar de la respuesta inmunitaria. En estos casos las MTs podrían afectar al estado redox de las células lo que a su vez podría influir sobre las vías de expresión génica a través de factores de transcripción como el NF- κ b que responden a cambios oxidativos en la célula. Lógicamente también podrían afectar al estado de la célula, de ser ciertos, mediante todos los mecanismos referentes a donación/captación de metales.

En el SNC también se han detectado efectos de las MTs sobre el crecimiento y la diferenciación de células. Este aspecto es destacable porque condujo al aislamiento de la MT-III (Uchida *et al.*, 1991), isoforma esencialmente cerebral, y ha abierto nuevas expectativas en el campo de las MTs cerebrales.

4.4. Funciones de las MTs cerebrales

Las MT-I y -II humanas incrementan su expresión en el SNC durante enfermedades neurodegenerativas como la AD (Duguid *et al.*, 1989; Nakajima *et al.*, 1991), la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Sillevis Smitt *et al.*, 1992a; Sillevis Smitt *et al.*, 1992b; Blaauwgeers *et al.*, 1994; Sillevis Smitt *et al.*, 1994) y el *scrapie* (Duguid *et al.*, 1989), entre otras. La inducción se produce principalmente en los astrocitos que se encuentran alrededor de las zonas lesionadas. En concreto, en la AD se produce alrededor de las placas seniles (Duguid *et al.*, 1989; Nakajima *et al.*, 1991), y durante la ALS en un subgrupo de astrocitos de la médula espinal (Sillevis Smitt *et al.*, 1992a; Sillevis Smitt *et al.*, 1992b; Blaauwgeers *et al.*, 1994; Sillevis

Smitt *et al.*, 1994). Las MT-I y -II también cambian sus niveles en respuesta a lesiones de muy diversa naturaleza. Incrementan su expresión en las áreas circundantes a lesiones provocadas por la administración de excitotoxinas como el NMDA (Acarin *et al.*, 1999b) y el ácido kaínico (KA) (Dalton *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1995a), gliotoxinas como el 6-aminonicotinamida (6-AN) (Penkowa *et al.*, 1997), por congelación (Penkowa and Moos, 1995; Penkowa *et al.*, 1999a) o por la isquemia/reperfusión (Neal *et al.*, 1996). Las células que sobreexpresan MT-I y -II son principalmente astrocitos (Penkowa and Moos, 1995; Penkowa *et al.*, 1997; Acarin *et al.*, 1999b; Penkowa *et al.*, 1999a), aunque también se ha observado inducción en células microgliales y/o monocitos infiltrados (Penkowa *et al.*, 1999a).

Estos cambios en la expresión de las MT-I y -II cerebrales sugieren que sus funciones podrían estar relacionadas con la protección del tejido frente a situaciones de daño o en la regeneración del mismo. Durante las lesiones cerebrales y situaciones que impliquen muerte celular se produce liberación al medio de metales pesados y radicales libres que podrían causar daños adicionales al tejido. Además, tanto los metales, en concreto el Zn; como los radicales libres se han propuesto como factores a tener en cuenta en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas. Por tanto, en el cerebro las MTs podrían tener funciones similares a las propuestas para las MTs hepáticas (Aschner *et al.*, 1997).

El cerebro es un órgano con gran concentración de Zn (El segundo catión divalente) (Frederickson and Moncrieff, 1994), que puede encontrarse formando parte de estructuras estables o englobado en vesículas (Pérez-Clausell and Danscher, 1985). En el SNC, además de las funciones clásicas de este metal, podría desempeñar un papel como neuromodulador (Weiss *et al.*, 1993; Harrison and Gibbons, 1994; Colom *et al.*, 1997; Dreixler and Leonard, 1997). Este metal ha de mantenerse bajo un estricto control homeostático puesto que un desequilibrio en sus concentraciones podría tener consecuencias graves en el funcionamiento cerebral (Ebadi *et al.*, 1994) y contribuir a la patología de ciertas enfermedades neurodegenerativas (Constantinidis, 1991; Cuajungco and Lees, 1997b; Cuajungco and Lees, 1997a). En este sentido el Zn extracelular acelera la precipitación del amiloide (componente mayoritario de las placas seniles) (Bush *et al.*, 1994; Esler *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997) y a elevadas concentraciones es neurotóxico (Yokoyama *et al.*, 1986; Choi *et al.*, 1988; Koh *et al.*, 1996). Por otra parte, el Zn también puede ejercer efectos intracelulares. Se ha observado que el *uptake* de Zn por parte de determinadas neuronas precede al proceso de degeneración provocado por el tratamiento con KA (Frederickson *et al.*, 1989; Yin *et al.*, 1998) y durante la isquemia (Koh *et al.*, 1996). Se ha podido comprobar que la recaptación de Zn precede a la muerte celular y que por tanto no puede considerarse una consecuencia de la misma (Koh *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que las enfermedades neurodegenerativas pueden tener un origen genético. En algunos casos se trata de mutaciones en genes relacionados con la defensa frente a los radicales libres. De hecho, una de las teorías más aceptadas sobre los factores etiológicos de enfermedades neurodegenerativas es la del estrés oxidativo (Coyle and Puttfarcken, 1993; Olanow, 1993). El cerebro es un órgano muy sensible a la acción de los

radicales libres por varias razones. En primer lugar existe gran cantidad de enzimas que producen radicales libres como consecuencia de su actividad, es un órgano que consume gran cantidad de O₂, sus membranas contienen una elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados que son especialmente susceptibles a este tipo de estrés y que además pueden iniciar reacciones en cadena; y finalmente posee menor cantidad de enzimas de defensa que otros órganos (Coyle and Puttfarcken, 1993). Una teoría propone que un desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas frente a los mismos podría provocar una serie de reacciones en cadena que en último término conduciría a la destrucción del parénquima nervioso (Olanow, 1993). De hecho se ha comprobado que los pacientes afectados de enfermedades neurodegenerativas poseen un mayor daño oxidativo que personas normales (Cassarino and Bennett, 1999; Markesbery and Carney, 1999). No obstante es difícil discernir si el estrés oxidativo se encuentra entre las causas o consecuencias de la enfermedad. Igualmente, durante lesiones al SNC se provoca un incremento de la producción de radicales libres que pueden contribuir al daño celular (Coyle and Puttfarcken, 1993; Piani and Fontana, 1994).

Algunos autores consideran que las reacciones inmunitarias podrían encontrarse en la base de la producción de determinadas enfermedades degenerativas o como mínimo afectar a su progresión (McGeer and McGeer, 1998a; McGeer and McGeer, 1998b; Popovic *et al.*, 1998). Como consecuencia de lesiones inflingidas al SNC también se provoca una respuesta inflamatoria (Ott *et al.*, 1987; Ott *et al.*, 1994). En el SNC, la inflamación presenta características que la diferencian de la que se puede producir en la periferia. La inflamación suele ser mucho más limitada, en un intento quizás por prevenir los efectos dañinos que una inflamación incontrolada podría tener sobre un tejido tan vulnerable. Otro de los hechos característicos es la gliosis. Es un proceso en el cual los astrocitos y la microglia se activan, cambian de morfología, proliferan y migran hacia el lugar de la lesión (Eddleston and Mucke, 1993). En este estado se convierten en células secretoras de citoquinas con lo cual pueden modular la respuesta inflamatoria (Rothwell and Strijbos, 1995; Holmin *et al.*, 1997; Rothwell, 1997). En cualquier caso durante la inflamación se liberan multitud de factores, entre ellos la IL-1 (Woodrooffe *et al.*, 1991; Yan *et al.*, 1992), la IL-6 (Gijbels *et al.*, 1990) y el TNF- α (Hunter *et al.*, 1992), que se conoce pueden desencadenar procesos apoptóticos (Weller *et al.*, 1994; Rice *et al.*, 1997; Ashley *et al.*, 1998; Stoll *et al.*, 1998) y afectar a la homeostasis del Zn (Young *et al.*, 1988; Ott *et al.*, 1994). Además en el curso de la inflamación el tejido se ve invadido por células monocitarias que cuando se activan incrementan extraordinariamente la tasa de producción de radicales libres y otros factores deletéreos para las neuronas (Piani and Fontana, 1994). Esto podría contribuir de manera significativa al mayor deterioro del parénquima cerebral. En este sentido es destacable el hecho que la sobreexpresión dirigida de varias citoquinas al SNC tiene como última consecuencia la aparición de procesos neurodegenerativos que en algunos casos pueden conducir a la muerte prematura del animal (Campbell *et al.*, 1993; Chiang *et al.*, 1994; Mucke *et al.*, 1995; Barnum *et al.*, 1996; Campbell, 1998; Stalder *et al.*, 1998).

Por tanto, cambios en las concentraciones de metales pesados y radicales libres, así como la respuesta inflamatoria pueden influir en el daño causado al tejido durante una lesión o enfermedades neurodegenerativas. No existen razones para pensar que las MT-I y -II no desempeñen en el cerebro las mismas funciones que se les atribuyen en el hígado. Las MT-I y -II podrían intervenir en la homeostasis de los metales pesados en el SNC, entre ellos el Zn, y prevenir muchos de los efectos nocivos de este metal gracias a su capacidad para ligarlos. En este sentido, aunque el déficit de las MT-I y -II no provoca un efecto significativo sobre los niveles totales de Zn (Masters *et al.*, 1994a), los animales MTKO presentan disminuido el Zn detectable inmunocitoquímicamente que se corresponde con el Zn vesicular (Penkowa *et al.*, 1999c). Además debido a la susceptibilidad del cerebro respecto al estrés oxidativo y la importancia que este puede tener en la etiología y/o progresión de enfermedades neurodegenerativas y situaciones de lesión en general, las MTs podrían tener en este órgano un valor relativo como defensa antioxidante superior al que se da en otros tejidos del organismo. Finalmente, no podemos despreciar el posible papel modulador de estas proteínas sobre la respuesta inmunitaria.

4.4.1 Metalotioneína-III

La MT-III fue descubierta debido a su propiedad de inhibir la supervivencia de neuronas corticales de rata en cultivo en presencia de extractos cerebrales humanos. Debido a las circunstancias de su descubrimiento, esta proteína fue denominada inicialmente como *growth inhibitory factor* (GIF) (Uchida *et al.*, 1991; Tsuji *et al.*, 1992). Posteriormente, como consecuencia de la gran homología existente con el resto de proteínas de la superfamilia de las MTs, se rebautizó como MT-III (Palmiter *et al.*, 1992; Tsuji *et al.*, 1992). El resto de isoformas no presentan efecto inhibitor en cultivo cuando son administradas junto a extractos cerebrales (Erickson *et al.*, 1994; Sewell *et al.*, 1995).

La actividad inhibidora de la supervivencia neuronal que muestra la MT-III sólo se observa en presencia de extracto cerebral. Cuando son administradas en ausencia de extracto, la MT-III incrementa la supervivencia de las neuronas en cultivos, al igual que las MT-I y -II que también han demostrado esta capacidad (Erickson *et al.*, 1994; Sewell *et al.*, 1995). Por tanto es probable que la MT-III ejerza su acción inhibidora mediante la interacción con otras moléculas presentes en el extracto cerebral.

El análisis mediante péptidos sintéticos y mutagénesis dirigida demuestra que la propiedad inhibidora del crecimiento de la MT-III radica en el extremo N-terminal de la proteína (Sewell *et al.*, 1995; Uchida and Ihara, 1995). La inserción de dos prolinas en la cadena polipeptídica de la MT-III respecto a la secuencia de las MT-I y -II conduce a la aparición del tetrapéptido CPCP en la zona N-terminal. La mutación de esta secuencia provoca la pérdida de la actividad inhibidora y la inserción en las MTs ubicuas provoca la ganancia de dicha actividad (Sewell *et al.*, 1995; Uchida and Ihara, 1995). Se ha propuesto que quizás gracias a este tetrapéptido se forma un motivo estructural que no estaría presente en las otras isoformas lo

cual le permitiría realizar las interacciones responsables de los efectos observados *in vitro* (Sewell *et al.*, 1995).

La MT-III, al igual que las isoformas ubicuas presenta alterada su expresión en algunas enfermedades neurodegenerativas y modelos de lesión cerebral. Esta isoforma disminuye su expresión en cerebros de personas afectadas del síndrome de Down (Arai *et al.*, 1997), enfermedad de Parkinson, ALS (Uchida, 1994; Hozumi *et al.*, 1998), y AD (Uchida *et al.*, 1991), aunque en este último caso otros estudios no han confirmado estos resultados (Erickson *et al.*, 1994; Amoureux *et al.*, 1997). Por el contrario incrementa sus niveles en el cortex cerebral de enfermos afectados de meningitis y del síndrome de Creutzfeldt-jakob (Hozumi *et al.*, 1998). Tras una lesión, ya sea esta isquémica (Inuzuka *et al.*, 1996; Yuguchi *et al.*, 1997; Yanagitani *et al.*, 1999), por ablación cortical (Anezaki *et al.*, 1995; Hozumi *et al.*, 1995; Yuguchi *et al.*, 1995a; Hozumi *et al.*, 1996), por transección nerviosa (Yuguchi *et al.*, 1995b) o excitotóxica (Anezaki *et al.*, 1995; Acarin *et al.*, 1999a), se produce un descenso de la expresión de MT-III. Posteriormente, se observa un incremento de los niveles de esta proteína. Por tanto la respuesta de la MT-III a las lesiones difiere de lo observado en el caso de las isoformas ubicuas sobretodo en las fases iniciales de la respuesta. En general, los cambios en la expresión de la MT-III se producen en los astrocitos circundantes a las áreas cerebrales donde se produce pérdida neuronal (Hozumi *et al.*, 1998).

Se ha especulado que la MT-III podría inhibir el crecimiento excesivo de neuronas en situación normal (Uchida, 1993). Un desequilibrio en su expresión podría conducir a alteraciones en el crecimiento de proyecciones neuronales provocando, en último termino, el desarrollo de patologías como la AD (Uchida *et al.*, 1991; Uchida, 1993; Uchida, 1994). Por otra parte también se ha sugerido que la MT-III podría jugar un papel importante en situaciones de daño al sistema nervioso en los que se produce una pérdida de neuronas (Hozumi *et al.*, 1998). En este sentido, una regulación adecuada de esta proteína podría contribuir a minimizar el daño y conducir a la correcta cicatrización del tejido. El descenso de los niveles de MT-III que se observa tras una lesión normalmente se considera que favorecería el desarrollo de proyecciones neuronales y en cierta medida el restablecimiento de las conexiones perdidas. Por otra parte, el incremento posterior de la MT-III obedecería a la necesidad de impedir un desarrollo excesivo de las neuronas (Hozumi *et al.*, 1998).

Las MTs ubicuas han demostrado poseer una actividad neurotrófica similar a la MT-III en ausencia de extracto cerebral. Por tanto, a pesar de que no existen datos experimentales que lo demuestren, es posible que las MT-I y -II intervengan en el control del desarrollo neuronal de una manera similar a lo propuesto para la MT-III.

A pesar que de momento no hay datos experimentales que lo confirmen, la MT-III también podría participar en las mismas funciones que se le atribuyen a las MTs ubicuas, es decir en el control homeostático de metales pesados y como antioxidante celular. De hecho, la distribución del mRNA de la MT-III coincide con la localización del Zn detectable inmunocitoquímicamente, es decir aquel que no está unido a proteínas y que se encuentra predominantemente en vesículas de secreción de neurotransmisores. Se ha propuesto que la

MT-III podría intervenir en los procesos que controlan el paso de este metal a las vesículas de secreción (Erickson *et al.*, 1997). Además, se ha observado que los animales KO para la MT-III presentan mayor pérdida neuronal tras la administración de KA (Erickson *et al.*, 1997). Por tanto podríamos atribuirle a esta isoforma propiedades protectoras en situación de lesión cerebral, presumiblemente por su posible acción como antioxidante y capacidad para ligar metales pesados.

En definitiva, tanto la MTs ubicuas como la MT-III podrían intervenir en la protección del parénquima cerebral en situaciones de lesión. En la presente tesis, entre otros objetivos, se estudia la regulación de las MTs en varios modelos de lesión cerebral y se intenta valorar la importancia de las MT-I y -II mediante el uso de ratones KOs para las mismas.

Objetivos

OBJETIVOS

1. Estudio de la regulación de las metalotioneínas hepáticas y cerebrales durante el estrés y la respuesta inflamatoria, atendiendo principalmente al posible papel de las citoquinas, fundamentalmente la interleuquina-6.
2. Estudio de las posibles funciones de las MTs cerebrales, particularmente en el contexto de lesiones del SNC, en concreto durante criolesión y lesiones excitotóxicas por la administración de KA.

Resultados

Trabajo 1

Regulation of the synthesis of brain metallothioneins

Neurotoxicology: 19: 661-666, 1998

Regulation of the Synthesis of Brain Metallothioneins

JUAN HIDALGO AND JAVIER CARRASCO

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Unidad de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain 08193

Abstract. JUAN HIDALGO AND JAVIER CARRASCO. Regulation of the Synthesis of Brain Metallothioneins. *Neurotoxicology* 19(4-5):661-666, 1998. Metallothioneins (MTs) are a family of low molecular weight proteins characterized by a high cysteine (about 30%) and heavy metal (Zn^{2+} , Cu^+) content. In rodents, there are four known MT isoforms, named MT-I to MT-IV. MT-I and MT-II are two widely expressed isoforms, while MT-III and MT-IV (isoforms recently discovered) have a more restricted expression, normally in the brain and in the keratinizing epithelia, respectively. Since all MT isoforms share a substantial homogeneity regarding their heavy metal binding properties, it seems feasible that they could also share physiological functions. However, the different pattern of expression suggest that the different MT isoforms could in addition have specific roles. Indeed, MT-III (or GIF) was initially discovered as a protein with apparent neuromodulatory effects, which were not shared by the normal counterparts MT-I and MT-II. To gain insight on the putative importance of these three MT isoforms in the brain, it is important to characterize their regulation in normal and pathophysiological states. In this review we summarize the major factors known to affect brain MT regulation. © 1998 Intox Press, Inc.

Key Words: Metallothionein-I, II, III, Stress, Inflammatory Response, Metals, Hormones, Cytokines, IL-6

INTRODUCTION

Metallothioneins (MTs) are a family of low molecular weight single polypeptide chain molecules (6-7 Kda) which bind zinc and/or copper under physiological conditions through thiolate bonds, and that are highly regulated during development and in adult animals. A number of books and reviews are available to the reader (Andrews, 1990; Bremner, 1987; Cousins, 1985; Hamer, 1986; Kägi and Nordberg, 1979; Kägi and Kojima, 1987; Riordan and Vallee, 1991; Sato and Bremner, 1993; Suzuki *et al.*, 1993).

In the mouse, there are four known isoforms classified as MT-I, -II, -III and -IV (Palmiter *et al.*, 1992; Quaife *et al.*, 1994; Tsuji *et al.*, 1992). MT-I and MT-II are the most widely distributed MT isoforms, being expressed in virtually all cells. In contrast to MT-I and MT-II, the expression of MT-III and MT-IV is normally restricted to the central nervous system (Palmiter *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1993) and to tissues containing stratified squamous epithelia (Quaife *et al.*, 1994), respectively. In pregnant mice, however, the four MT isoforms are expressed in the maternal deciduum (Liang *et al.*, 1996).

In comparison with peripheral tissues, little is known regarding brain MTs. Some reviews are available which deal specifically with brain MTs (Aschner, 1996; Aschner *et al.*, 1997; Ebadi *et al.*, 1995; Hidalgo *et al.*, 1994; 1997b). Here we will emphasize what is known of brain MT regulation within a physiological perspective. We apologize to those authors who made relevant contributions and that are not referenced, but space constraints limited a full description of several studies. An expanded version of this minireview is available (Hidalgo *et al.*, 1997b).

EXPRESSION OF METALLOTHIONEINS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

MT-I+II are present throughout the brain and spinal cord especially in astrocytes, but also in ependymal cells, epithelial cells of choroid plexus, meningeal cells of the pia matter and endothelial cells of blood vessels, whereas microglia and oligodendrocytes appear to be essentially devoid of MT-I+II (Blaauwgeers *et al.*, 1993; Hidalgo *et al.*, 1994; Nishimura *et al.*, 1992; Penkowa and Moos, 1995;

Please send request for reprints to Dr. Juan Hidalgo, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Unidad de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain 08193.

Presented at the Sixth Meeting of the International Neurotoxicology Association, Szeged, Hungary, June 29 - July 4, 1997.

Submitted: July 24, 1997. Accepted: November 21, 1997.

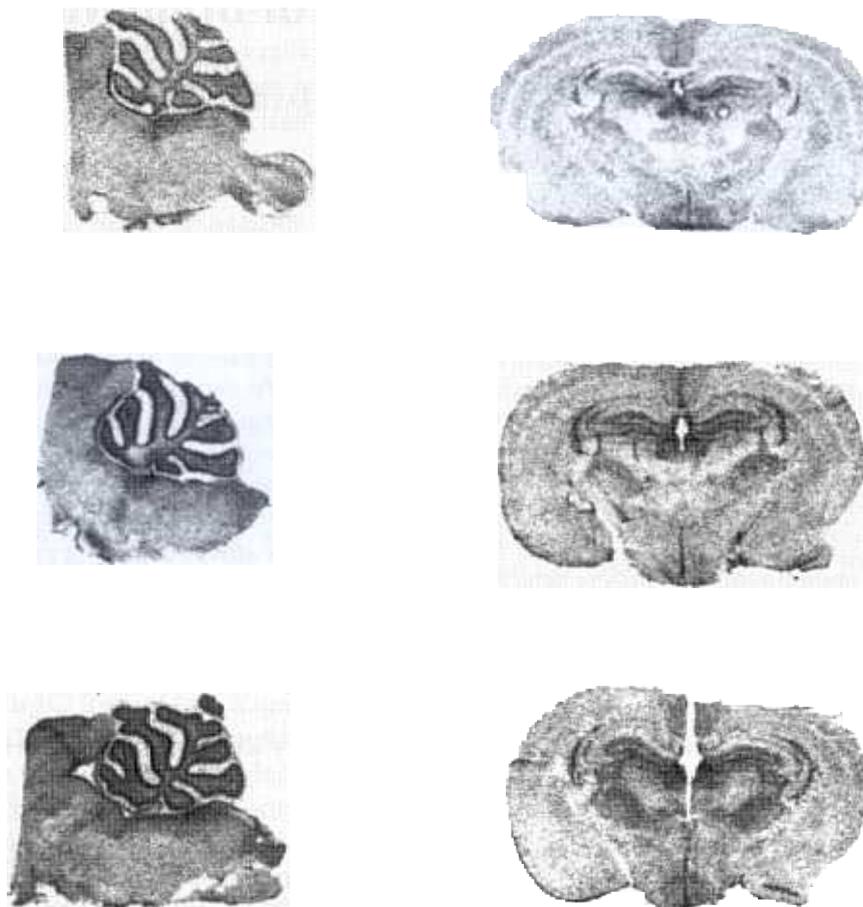


FIG. 1. Effect of immobilization stress and endotoxin on mouse brain MT-I mRNA levels in in situ hybridization experiments. A dramatic upregulation of the MT-I isoform throughout the brain compared with controls (C) is clearly observed. The pattern of the induction caused by stress (S, 5 hours of immobilization stress) and endotoxin (E, 5 hours after the administration of 0.1 mg/kg) is comparable, but the factors involved differ since the response in IL-6 KO mice is blunted only for endotoxin (manuscript in preparation).

Young *et al.*, 1991). Immunoreactivity in neurons is only seen in selective neuron populations (Hidalgo *et al.*, 1994; Kinningham *et al.*, 1995). MT-I levels are several fold higher in primary cultures of astrocytes than in those of neurons (Hidalgo *et al.*, 1994; Kramer *et al.*, 1996a,b). It seems that reactive but not resting microglial cells are able to synthesize MT-I+II *in vivo* (Vela *et al.*, 1997). Studies in human brains indicated an astrocytic localization of MT-III (Uchida *et al.*, 1991). However, Masters *et al.* (1994) demonstrated that in the mouse MT-III is expressed predominantly in neurons.

zinc and copper, hormones, stressful agents and inflammatory response-related stimuli, and many more. Very little is known of MT-III regulation. In some cases, the mechanism of action of the MT inducers has been determined, but generally how these factors affect MT synthesis remain unknown. The data suggest that many of them will affect MT regulation through eliciting a stress or inflammatory response, which may be postulated as major physiological regulators of these proteins. Here we will discuss MT regulation specifically in the brain.

Heavy Metals

Heavy metals such as zinc and copper control the rate of transcription of the MT-I+II genes by interacting with trans-acting regulatory element binding factors which, in turn, bind to cis-acting DNA sequences present in the promoter region, known as metal regulatory

REGULATION OF THE SYNTHESIS OF BRAIN METALLOTHIONEIN ISOFORMS

MT-I+II are dramatically up-regulated, in a coordinate manner (Searle *et al.*, 1984), by factors such as

elements (MREs). Because of the blood-brain barrier, MT-I+II are induced only when zinc is injected i.c.v. (Ebadi, 1986; Gasull *et al.*, 1994b; Paliwal *et al.*, 1990). It is likely that the major brain cells types will respond in vivo inducing MT-I+II synthesis. Thus, astrocytes, neurons, and microglia (Agulló *et al.*, submitted; Hidalgo *et al.*, 1994; Kramer *et al.*, 1996a,b) have been reported to produce more MT-I+II in the presence of zinc, copper or both. The human and mouse MT-III genes contain MREs (Naruse *et al.*, 1994), but it seems that MT-III expression is not affected by zinc in astrocytes (Kramer *et al.*, 1996a; Masters *et al.*, 1994) whereas they are slightly decreased in neurons (Kramer *et al.*, 1996b).

Glucocorticoids

Glucocorticoids are also major regulators of the MT-I+II isoforms (Andrews, 1990; Hamer, 1986). These hormones control the rate of transcription of the MT-I+II genes after binding to their specific receptors which then gain affinity for specific sequences of the MTs promoter region known as glucocorticoid responsive elements (GREs). Rat brain MT-I+II protein levels are increased in most brain areas by glucocorticoids (Gasull *et al.*, 1994b; Hidalgo *et al.*, 1994), and also involved in the maintenance of basal MT-I+II levels (Gasull *et al.*, 1994b; Hidalgo *et al.*, 1997a). Despite the absence of GREs in the MT-III gene promoter region (Naruse *et al.*, 1994), glucocorticoids could have some role in MT-III regulation (Belloso *et al.*, 1996; Hidalgo *et al.*, 1997a; Kramer *et al.*, 1996a,b; Zheng *et al.*, 1995).

Stress

Fig. 1 shows the effect of stress on brain MT-I mRNA levels. The overall tendency of stress is to upregulate brain MT-I+II expression (Belloso *et al.*, 1996; Gasull *et al.*, 1994a; Hidalgo *et al.*, 1990, 1991, 1994, 1997a,b). Glucocorticoids appear to mediate the effect of stress on MT-I+II levels of some brain areas (cerebellum and presumably medulla+pons and frontal cortex) as suggested by adrenalectomy experiments (Hidalgo *et al.*, 1997a). However, in other brain areas such as the hypothalamus no effect of adrenalectomy is observed. Studies inhibiting catecholamine synthesis or blocking their receptors indicated that central monoamines were not involved in brain MT-I+II response to stress in any of the brain areas studied (Gasull *et al.*, 1994a). MT-III responded to stress differently to the other MT isoforms (Belloso *et al.*, 1996; Hidalgo *et al.*, 1997a). In situ hybridization experiments suggest that MT-III mRNA levels increase in the cerebellum, whereas there is a great variation in the cerebrum cortex.

Cytokines-Inflammatory Response

Fig. 1 shows the effect of endotoxin on brain MT-I mRNA levels. The expression of the MT-I+II isoforms is up-regulated in the brain of mice and rats injected with endotoxin, a component of Gram negative bacteria that elicits the inflammatory response, suggesting that cytokines may be involved in brain MTs regulation (Choudhuri *et al.*, 1993, 1995; De *et al.*, 1990; Itano *et al.*, 1991; Palmiter *et al.*, 1992; Searle *et al.*, 1984; Zheng *et al.*, 1995). MT-I+II expression is up-regulated by the major cytokines IL-1 and IL-6 in established cell lines (Bauer *et al.*, 1993; Kikuchi *et al.*, 1993; Sawada *et al.*, 1994). However, we did not observe a significant effect of either IL-1 or IL-6 on MT-I+II levels in rat (Hidalgo *et al.*, 1994) or mouse astrocytes (Hernández *et al.*, 1997), results confirmed by Kramer *et al.* (1996a). In contrast, a clear induction of MT-I+II in several brain areas is observed in rats injected i.c.v. with IL-1 and IL-6 (Hernández and Hidalgo, 1998), which strongly suggests that these cytokines exert their effects on MT synthesis in the proper physiological context and presumably in concert with other factors. Regarding MT-III expression in the brain, little is known of the role of cytokines. Endotoxin has been reported either not to affect MT-III expression or to decrease it (Hernández *et al.*, 1997; Palmiter *et al.*, 1992; Zheng *et al.*, 1995).

We have recently undertaken studies (Hernández *et al.*, 1997) with transgenic mice expressing IL-6 under the regulatory control of the glial fibrillary acidic protein gene promoter (GFAP-IL6 mice) (Campbell *et al.*, 1993), which show progressive neurodegeneration, astrocytosis, microgliosis, angiogenesis and up-regulation of several inflammatory and other host-response genes (Barnum *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 1993; Chiang *et al.*, 1994; Heyser *et al.*, 1997). They also have impaired hippocampal electrophysiology (Steffensen *et al.*, 1994) and develop a progressive learning deficit (Heyser *et al.*, 1997). MT-I+II levels were elevated in the cerebellum (highest induction), medulla plus pons, hypothalamus and remaining brain (lowest induction), but not in hippocampus. These increases correlated with the associated inflammatory response caused by the transgene expression of IL-6, and, furthermore, were comparable to the expression of the acute-phase response gene EB22/5 (Campbell *et al.*, 1993; Chiang *et al.*, 1994). Mutant mice with targeted disruption of the IL-6 gene (IL-6 KO mice) (Kopf *et al.*, 1994) demonstrate that after endotoxin administration, a situation where the acute-phase response is activated, the absence of IL-6 greatly decreases MT-I+II induction; in contrast, brain MT-I+II response to stress remains basically unaffected in IL-6 KO mice (manuscript in preparation). The results suggest that MT-I+II could be considered

acute-phase response proteins in the brain as it has generally been assumed for the liver. In situ hybridization studies in the GFAP-IL6 mice and IL-6 deficient mice indicate that MT-III mRNA levels decrease in some brain areas but increase in others (manuscript in preparation).

SUMMARY

Compelling data discussed above suggest that important roles of the widely expressed MT isoforms, MT-I+II, and the CNS specific one, MT-III, are plausible for normal brain physiology. The three brain MT isoforms readily respond to stressful conditions, inflammatory processes and a number of neurodegenerative diseases, suggesting that these proteins are likely to be involved in protective (e.g. antioxidant) and reparative (e.g. neurotrophic) mechanisms.

ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks are given to H. Bluethmann and I.L. Campbell for providing us with precious mice. The financial support is also gratefully appreciated: CIRIT 1995SGR 00499, DGICYT PB94-0667, and CICYT SAF96-0189. J.C. is a fellow of the CIRIT, FI/96-2613.

REFERENCES

- Andrews GK.** Regulation of metallothionein gene expression. *Prog Food Nutr Sci* 1990; 14:193-258
- Aschner M.** The functional significance of brain metallothioneins. *FASEB J* 1996; 10:1129-1136
- Aschner M, Cherian MG, Klaassen CD, Palmiter RD, Erickson JC, Bush AI.** Metallothioneins in brain—the role in physiology and pathology. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 142:229-249
- Barnum SR, Jones JL, Müller-Ladner U, Samimi A, Campbell IL.** Chronic complement C3 gene expression in the CNS of transgenic mice with astrocyte-targeted interleukin-6 expression. *Glia* 1996; 18:107-117
- Bauer J, Ganter U, Abel J, Strauss S, Jonas U, Weib R, Gebicke-Haerter P, Volk B, Berger M.** Effects of interleukin-1 and interleukin-6 on metallothionein and amyloid precursor protein expression in human neuroblastoma cells. *J Neuroimmunol* 1993; 45:163-174
- Belloso E, Hernández J, Giralt M, Kille P, Hidalgo J.** Effect of stress on mouse and rat brain metallothionein I and III mRNA levels. *Neuroendocrinology* 1996; 64:430-439
- Blaauwgeers HGT, Sillevs Smitt PAE, de Jong JMBV, Troost D.** Distribution of metallothionein in the human central nervous system. *Glia* 1993; 8:62-70
- Bremner I.** Interactions between metallothionein and trace elements. *Prog Food Nutr Sci* 1987; 11:1-37
- Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MBA, Mucke L.** Neurologic disease in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:10061-10065
- Chiang C-S, Stalder A, Samimi A, Campbell IL.** Reactive gliosis as a consequence of interleukin 6 expression in the brain: studies in transgenic mice. *Dev Neurosci* 1994; 16:212-221
- Choudhuri S, Kramer KK, Berman NEJ, Dalton TP, Andrews GK, Klaassen C D.** Constitutive expression of metallothionein genes in mouse brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 131:144-154
- Choudhuri S, McKim JM Jr, Klaassen CD.** Differential expression of the metallothionein gene in liver and brain of mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 119:1-10
- Cousins RJ.** Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev* 1985; 65:238-309
- De SK, McMaster MT, Andrews GK.** Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. *J Biol Chem* 1990; 265:15267-15274
- Ebadi M.** Biochemical characterization of a metallothionein-like protein in rat brain. *Biol Trace Element Res* 1986; 11:101-115
- Ebadi M, Iversen PL, Hao R, Cerutis DR, Rojas P, Happe HK, Murrin LC, Pfeiffer RF.** Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem Int* 1995; 1-22
- Gasull T, Giralt M, García A, Hidalgo J.** Regulation of metallothionein-I+II levels in specific brain areas and liver in the rat: role of catecholamines. *Glia* 1994a; 12:135-143
- Gasull T, Giralt M, Hernández J, Martínez P, Bremner I, Hidalgo J.** Regulation of metallothionein concentrations in rat brain: effect of glucocorticoids, zinc, copper, and endotoxin. *Am J Physiol* 1994b; 266:E760-E767
- Hamer DH.** Metallothionein. *Ann Rev Biochem* 1986; 55:913-951
- Hernández J, Hidalgo J.** Endotoxin and intracerebroventricular injection of IL-1 and IL-6 induce rat brain metallothionein-I and -II. *Neurochem Int* 1998; in press
- Hernández J, Molinero A, Campbell IL, Hidalgo J.** Transgenic expression of interleukin 6 in the central nervous system regulates brain metallothionein-I and -III expression in mice. *Mol Brain Res* 1997; 48:125-131
- Heyser CJ, Masliah E, Samimi A, Campbell IL, Gold LH.**

- Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1500-1505
- Hidalgo J, Belloso E, Hernández J, Gasull T, Molinero A.** Role of glucocorticoids on rat brain metallothionein-I and -III to stress. *Stress* 1997a; 1:231-240
- Hidalgo J, Borrás M, Garvey JS, Armario A.** Liver, brain and heart metallothionein induction by stress. *J Neurochem* 1990; 55:651-654
- Hidalgo J, Campmany L, Martí O, Armario A.** Metallothionein-I induction by stress in specific brain areas. *Neurochem Res* 1991; 16:1145-1148
- Hidalgo J, Castellano B, Campbell IL.** Regulation of brain metallothioneins. *Current Topics Neurochem* 1997b; 1:1-26
- Hidalgo J, Garcia A, Oliva AM, Giralt M, Gasull T, Gonzalez B, Milnerowicz H, Wood A, Bremner I.** Effect of zinc, copper and glucocorticoids on metallothionein levels of cultured neurons and astrocytes from rat brain. *Chem-Biol Interact* 1994; 93:197-219
- Hidalgo J, Gasull T, Giralt M, Armario A.** Brain metallothionein in stress. *Biol Signals* 1994; 3:198-210
- Itano Y, Noji S, Koyama E, Taniguchi S, Taga N, Takahashi T, Ono K, Kosaka F.** Bacterial endotoxin-induced expression of metallothionein genes in rat brain, as revealed by in situ hybridization. *Neurosci Lett* 1991; 124:13-16
- Kägi JHR, Nordberg M,** eds., *Metallothionein I*, Basel, Birkhäuser Verlag, 1979
- Kägi JHR, Kojima Y,** eds., *Metallothionein II*, Basel, Birkhäuser Verlag, 1987
- Suzuki KT, Imura N, Kimura M,** eds., *Metallothionein III*, Basel, Birkhäuser Verlag, 1993
- Kikuchi Y, Irie M, Kasahara T, Sawada J-I, Terao T.** Induction of metallothionein in a human astrocytoma cell line by interleukin-1 and heavy metals. *Febs Lett* 1993; 317:22-26
- Kiningham K, Bi X, Kasarkis EJ.** Neuronal localization of metallothioneins in rat and human spinal cord. *Neurochem Int* 1995; 27:105-109
- Kobayashi H, Uchida Y, Ihara Y, Nakajima K, Kohsaka S, Miyatake T, Tsuji S.** Molecular cloning of rat growth inhibitory factor cDNA and the expression in the central nervous system. *Mol Brain Res* 1993; 19:188-194
- Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Köhler G.** Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994; 368:339-342
- Kramer KK, Liu J, Choudhuri S, Klaassen CD.** Induction of metallothionein mRNA and protein in murine astrocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996a; 136:94-100
- Kramer KK, Zoelle JT, Klaassen CD.** Induction of metallothionein mRNA and protein in murine neuron cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996b; 141:1-7
- Liang L, Fu K, Lee DK, Sobieski RJ, Dalton T, Andrews GK.** Activation of the complete mouse metallothionein gene locus in the maternal deciduum. *Mol Reproduction Dev* 1996; 43:25-37
- Masters BA, Quaife CJ, Erickson JC, Kelly EJ, Froelick GJ, Zambrowicz BP, Brinster RL, Palmiter RD.** Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci* 1994; 14:5844-5857
- Naruse S, Igarashi S-I, Furuya T, Kobayashi H, Miyatake T, Tsuji S.** Structures of the human and mouse growth inhibitory factor-encoding genes. *Gene* 1994; 144:283-287
- Nishimura N, Nishimura H, Ghaffar A, Tohyama C.** Localization of metallothionein in the brain of rat and mouse. *J Histochem Cytochem* 1992; 40:309-315
- Paliwal VK, Iversen PL, Ebadi M.** Regulation of zinc metallothionein II mRNA level in rat brain. *Neurochem Int* 1990; 17:441-447
- Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM.** MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:6333-6337
- Penkowa M, Moos T.** Disruption of the blood-brain interface in neonatal rat neocortex induces a transient expression of metallothionein in reactive astrocytes. *Glia* 1995; 13:217-227
- Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD.** Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 1994; 33:7250-7259
- Riordan JE, Vallee BL,** eds., *Methods in Enzymology*, 205, Metallobiochemistry, part B: Metallothionein and related molecules, San Diego, Academic Press, 1991
- Sato M, Bremner I.** Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radical Biol Med* 1993; 14:325-337.
- Sawada J-I, Kikuchi Y, Shibutani M, Mitsumori K, Inoue K, Kasahara T.** Induction of metallothionein in astrocytes by cytokines and heavy metals. *Biol Signals* 1994; 3:157-168
- Searle PF, Davison BL, Stuart GW, Wilkie TM, Norstedt G, Palmiter RD.** Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein I and II genes. *Mol Cell Biol* 1984; 4:1221-1230
- Steffensen SC, Campbell IL, Henriksen SJ.** Site-specific hippocampal pathophysiology due to cerebral

- overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. *Brain Res* 1994; 652:149-153
- Tsuji S, Kobayashi H, Uchida Y, Ihara Y, Miyatake T.** Molecular cloning of human growth inhibitory factor cDNA and its down-regulation in Alzheimer's disease. *Embo J* 1992; 11:4843-4850
- Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M.** The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 1991; 7:337-347.
- Vela JM, Hidalgo J, González B, Castellano B.** Induction of metallothionein in astrocytes and microglia in the spinal cord from the myelin-deficient jimpy mouse. *Brain Res* 1997; 767:345-355
- Young JK, Garvey JS, Huang PC.** Glial immunoreactivity for metallothionein in the rat brain. *Glia* 1991; 4:602-610
- Zheng H, Berman NEJ, Klaassen CD.** Chemical modulation of metallothionein I and III mRNA in mouse brain. *Neurochem Int* 1995; 27:43-58