

## LAS METALOTIONEÍNAS Y SU RELACIÓN CON LA TOXICIDAD DEL CADMIO EN LOS MAMÍFEROS

Leticia GARCÍA-RICO, Ma. del Refugio ROBLES-BURGUEÑO  
y Elisa M. VALENZUELA-SOTO

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado Postal 1735, Hermosillo, Sonora, México

(Recibido agosto 1998, aceptado marzo 1999)

Palabras clave: metalotioneína, desintoxicación, metales pesados, cadmio, toxicidad

### RESUMEN

En este trabajo se hace una síntesis sobre las características y propiedades fundamentales de las metalotioneínas en los mamíferos y su relación con la toxicidad del cadmio. Desde su purificación hace treinta y ocho años a partir de la corteza renal de caballo, esta proteína fue identificada como agente desintoxicante de metales pesados como cadmio, mercurio, plata, platino, dedicándose una gran cantidad de investigaciones a la caracterización de este mecanismo. El cadmio es un metal pesado muy distribuido en la naturaleza, que se acumula en diversos tejidos provocando un amplio espectro de efectos tóxicos en los mamíferos. Con respecto a la metalotioneína se presenta: 1. clasificación, 2. propiedades, 3. información genética en varias especies, 4. metabolismo y 5. algunos aspectos metodológicos para su purificación y caracterización. En cuanto al cadmio se resume la información sobre los niveles de este metal en los tejidos de mamíferos.

### ABSTRACT

In this paper, the characteristics and main properties of mammalian metallothioneins and their relationship with cadmium toxicity are reviewed. This protein was first isolated thirty eight years ago from the equine renal cortex. At that time, it was characterized as a metal detoxificant agent for cadmium, mercury, silver, and platinum. Since then, a great amount of research has been directed to understand the detoxifying mechanism of this protein. In the nature, cadmium is a heavy metal with width distribution. In mammals, it produces a broad spectrum of toxic effects as it accumulates in diverse tissues. With regard to the metallothionein, this paper presents: 1. classification, 2. properties, 3. genetic information in several species, 4. metabolism and 5. some methodological aspects for its purification and characterization. In concern to cadmium, we report the levels of this metal in mammalian tissues.

### INTRODUCCIÓN

Los metales como el cadmio se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, lo que hace inevitable que se acumulen a través de toda la cadena alimenticia. Esto es muy importante desde el punto de vista toxicológico, ya que el cadmio presenta un gran espectro de efectos tóxicos, incluyendo nefrotoxicidad, hipertensión y osteomalacia (Reilly 1980, Cherian 1989, García-Rico y Jara-Marini 1996).

Un alto porcentaje del cadmio que penetra al organismo se absorbe y sólo una pequeña parte es excretada (estimándose una vida media de 10 años), lo que ocasiona su depósito en

órganos tales como hígado y riñón, en donde se ha observado que alrededor del 80 % de este metal se encuentra enlazado a ciertas proteínas llamadas metalotioneínas (MT) (Webb y Cain 1982, Torra *et al.* 1994).

### Antecedentes

Las metalotioneínas fueron aisladas por primera vez por Margoshes y Vallee (1957) a partir de riñón de caballo. Posteriormente fueron caracterizadas por Kägi y Vallee (1960) logrando purificar una proteína con alto contenido de cadmio (Cd), zinc (Zn) y azufre (S). La proteína representó el 1 % del peso total de la corteza renal de equino, los autores estimaron

que todo el Cd y el 60 % del Zn estaban unidos a esta proteína. Desde entonces estas proteínas se han aislado de tejidos de mamíferos, plantas y levaduras, observándose gran variedad de funciones en cada especie, lo que ha hecho difícil establecer un papel biológico específico para estas moléculas (Webb y Cain 1982, Vallee 1991, Florence *et al.* 1992).

Posteriormente, en experimentos con mamíferos se demostró que dosis repetidas de Cd provocan tanto la acumulación del metal como de la MT a la cual éste se enlaza (Cherian y Goyer 1978, Gallant y Cherian 1987). Estos resultados hicieron suponer que la síntesis de la proteína se daba como una respuesta celular a la presencia de Cd y que la unión del metal a la proteína podría estar funcionando como un mecanismo de desintoxicación. Esta hipótesis aumentó el interés por las metalotioneínas, especialmente por definir su función como una defensa durante la exposición crónica a bajas concentraciones de Cd (Banerjee *et al.* 1982, Cherian 1989). Sin embargo, hasta hoy no se ha podido dilucidar el mecanismo de acción de esta proteína.

### Clasificación

Las MTs se clasifican y nombran con base en el metal que ligan. Una MT que contiene un solo metal (por ej. Cd) se le denomina cadmio-metalotioneína (Cd-MT) ó Cd-tioneína (Kojima 1991). Si se estiman las características estructurales, las MTs se subdividen en las siguientes clases (Kägi y Valle 1960, Kägi y Kojima 1987):

- I: Polipéptidos con estructura primaria muy relacionada con las MTs renales de equino.
- II: Polipéptidos en los cuales la localización de las cisteínas es muy distinta a la metalotioneína renal de equino.
- III: Polipéptidos atípicos que no son traducionalmente sintetizados como metal-tiol.

### Propiedades

Inicialmente el término "metalotioneína" se utilizó para designar a la proteína procedente de la corteza renal de equino, rica en Cd, Zn y S. La Segunda Reunión Internacional de Metalotioneínas y otras Proteínas de Bajo Peso Molecular

definió a las metalotioneínas como todos los polipéptidos tiolados que poseen características semejantes a la metalotioneína de equino (Kojima 1991).

Las MTs se han aislado y caracterizado a partir de numerosos tejidos de vertebrados, plantas y en varios procariotos (**Tabla I**). En muchas especies incluyendo a los mamíferos, donde se han realizado los estudios más extensos, las MTs usualmente contienen 61 residuos aminoácidos (Searle *et al.* 1984, Kägi y Kojima 1987). Sin embargo, en ciertos invertebrados y en hongos se han encontrado formas más pequeñas de MTs (Winge *et al.* 1984, Butt *et al.* 1986).

En las 37 MTs de mamíferos ahora conocidas, 56% de todos los residuos están conservados en la evolución, entre ellos se encuentran las 20 cisteínas y casi todas las lisinas y argininas. Muchas sustituciones son química y espacialmente conservadoras, es interesante notar la ausencia de residuos aromáticos y la escasa presencia de residuos alifáticos (Kaji *et al.* 1995).

Las MTs puras generalmente contienen de 4 a 12 átomos por mol de cadmio, zinc, mercurio o cobre (Hamer 1986). Los experimentos donde se eluyeron los metales presentes en la proteína, mostraron que las MTs aisladas de fuentes *in vivo* contienen diferentes metales por polipéptido y que esto depende del organismo del cual la proteína fue aislada. Experimentos de reconstitución con MTs aisladas de humanos y metales puros muestran que por cada mol de proteína, se unen 7 átomos de Zn, Cd ó Hg ó 12 átomos en el caso del Cu. El metal más frecuentemente encontrado es el Cd, en ausencia de disulfuro (Nartey y Cherian 1987, Vallee 1991). A diferencia de otras proteínas, las MTs presentan un máximo de absorbancia a 250 nm y no a 280 nm, lo que puede deberse a la ausencia de aminoácidos aromáticos.

### Regulación génica

Las metalotioneínas son familias de proteínas polimorfas con subfamilias, subgrupos e isoformas. En los vertebrados (**Fig. 1**), todos los genes de las MTs están divididos en una región flanqueando el extremo 5' (5'UT), una región 5' no traducible, (5'UTR), 3 exones separados por 2 intrones y un extre-

**TABLA I.** ESTRATEGIAS DE CLONACIÓN Y DE AISLAMIENTO DEL cDNA Y DE GENES QUE CODIFICAN PARA LAS METALOTIONEÍNAS

Fuente	Clonación basada en:				Referencia
	Secuencia de aminoácidos	Anticuerpos	Expresión	Hibridización	
Ave: pollo, pavo	-	-	-	cDNA	Andrews <i>et al.</i> (1996)
Ratón: hígado	-	-	-	cDNA	Searle <i>et al.</i> (1984)
Nematodos:				PCR/carboxi	Freedman <i>et al.</i> (1993)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	-	-	-	terminal	
Plantas: <i>Vicia faba</i>	-	-	-	cDNA	Foley <i>et al.</i> (1997)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-	-	DNA	Zhou y Goldsbrough (1995)
<i>Sambucus nigra</i>	-	-	-	cDNA	Coupe <i>et al.</i> (1995)
Humano: células B	-	-	-	cDNA	Brugnera <i>et al.</i> (1994)
piel,	-	-	-	cDNA	Quaife <i>et al.</i> (1994)
cultivos celulares	-	-	-	DNA	Karin y Richards (1984) Richards <i>et al.</i> (1984)

mo final 3'. Los mamíferos poseen genes para 4 subfamilias: las MTs ubicuas MT-1 y MT-2, la específica de cerebro MT-3 y la específica de epitelio MT-4. Además todos los genes se localizan en un solo cromosoma (Quaife *et al.* 1994). La región 5'UTR contiene elementos reguladores, entre ellos una o más copias de elementos que responden a metales llamados MRE (Stuart *et al.* 1985). Se ha descrito una secuencia consenso de 15 nucleótidos CTNTGCRCNCGGCC donde R es una purina y N cualquier base y su secuencia central muy conservada TGCRNC es requerida para la unión del factor proteico activador de la transcripción (MTF-1) (Binz y Kägi 1997). Los números de MREs y sus posiciones en la hebra codificante o no-codificante en la región 5'UTR de los genes de MT de vertebrados correlacionan con la especificidad de subgrupo.

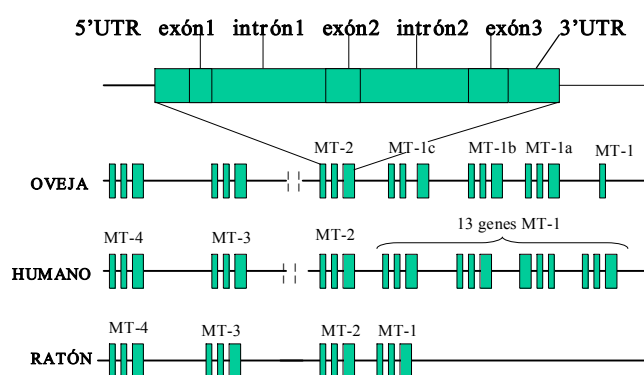


Fig. 1. Mapas genéticos que incluyen a los genes que codifican para diferentes metalotioneínas en oveja, humano y ratón. Ampliación del mapa físico de la metalotioneína MT-2

Se han aislado por lo menos 10 genes que codifican para estas proteínas en humanos, sólo cinco son expresados (Karin y Richards 1984). El nivel de expresión varía dependiendo del tipo de tejido. Los genes humanos MT-1a y MT-2a han sido aislados por hibridación *in situ* de genes clonados de cromosomas de células somáticas (Le Beau *et al.* 1985). El gene MT-1a codifica para una proteína de 61 aminoácidos, su transcripción es estimulada por compuestos de Cd y concentraciones muy elevadas de Zn (Richards *et al.* 1984). El gen MT-2a codifica para una proteína que difiere sólo en cuatro aminoácidos con respecto a MT-1a (Hamer 1986).

La diferencia en sólo cuatro aminoácidos parece producir una preferencia por el ión metálico entre las dos formas de metalotioneínas, MT-1 prefiere al Cd y MT-2 prefiere al Zn. El nivel de transcripción de MT-2a es 5 veces mayor que el de MT-1a, igualmente contiene una secuencia que es estimulada por Zn y Cd. Adicionalmente este gene tiene una secuencia que responde a estimulación por el glucocorticoide dexametasona (GRE) y un elemento que responde a interferón (IRE) así como una región responsable de la respuesta inflamatoria.

La expresión de los genes de las metalotioneínas parece ser un circuito homeostático complejo, que involucra regulación transcripcional, efectores alostéricos y degradación de proteínas.

### Metabolismo y toxicidad del cadmio

Los estudios realizados con animales de experimentación han demostrado que debido a los contenidos elevados de Zn y Cu hepáticos durante el desarrollo perinatal, la MT se encuentra almacenada intracelularmente. Se ha propuesto que los niveles altos de Zn y Cu presentes en esta etapa se deben al incremento en los requerimientos de dichos metales tanto del ADN como de las ARN polimerasas, así como de las aproximadamente 300 enzimas que requieren de estos cofactores para llevar a cabo su función en los diferentes procesos metabólicos en los que están involucradas (Gallant y Cherian 1987, Chan y Cherian 1993a,b, Kaji *et al.* 1995).

Se ha propuesto que la MT en humanos tiene como función principal almacenar Zn en el hígado durante el desarrollo perinatal y en los primeros días de vida (Chung *et al.* 1986). En estudios con humanos se ha encontrado una correlación alta entre las MT, los niveles de Cd y Zn en riñón y la edad. La concentración máxima de Cd se da entre los 40 y 60 años y la de MT entre los 20 y 40 años, para posteriormente en ambos casos, disminuir su concentración. Este descenso puede estar asociado con las excreciones urinarias elevadas de metales debido a cambios en las funciones renales, sin embargo es necesario realizar estudios más extensos para determinar la razón de este descenso, ya que la correlación alta de la MT con respecto al Cd puede ser un índice importante para confirmar la exposición a metales pesados (Chung *et al.* 1986, Torra *et al.* 1994).

Por otro lado se ha observado que al administrar sales de Cd en animales de experimentación, éste se transporta a través del torrente sanguíneo acumulándose inicialmente en el hígado, donde se induce la síntesis de la MT. Posteriormente el Cd hepático continúa su camino hacia el riñón, posiblemente en forma extracelular como Cd-MT. Este complejo es una potente nefrotoxina que tiene una vida media mayor a la de Zn-MT y que afecta los túbulos proximales (Torra *et al.* 1994). Cuando la concentración de Cd en tejido renal alcanza los niveles críticos (100-200 µg/g) se producen los daños tubulares. Este efecto tóxico también se ha demostrado al administrar directamente Cd-MT tanto en ratas como en células del epitelio renal, encontrándose que una concentración de 10 µg Cd/g de corteza renal es suficiente para producir daños renales. Este valor contrasta significativamente con el valor precautorio recomendado durante la exposición crónica al Cd (200 µg/g), así como el detectado en estudios en donde se han administrado sales de Cd (100-200 µg/g).

También existen evidencias de que concentraciones de 6 µg Cd/g acumulado en el riñón son capaces de iniciar el bloqueo de la absorción de los metales esenciales Zn y Cu (Onosaka *et al.* 1984, Gallant y Cherian 1987, Ohta *et al.* 1989, Douglas *et al.* 1991, Kaji *et al.* 1995).

En estudios recientes utilizando marcadores más sensibles, se han observado los efectos tempranos de nefrotoxicidad del Cd a concentraciones de 50 µg/g. Se estima que entre el 50 y el 70 % del Cd acumulado se encuentra unido a la MT, por ello es importante investigar el riesgo que representa el no enlazado (Torra *et al.* 1994). A pesar de que no existe concordancia entre estos resultados, los diferentes estudios refuerzan la idea de que el complejo Cd-MT es más nefrotóxico que las sales de Cd y que este complejo intracelular parece ejercer un efecto protector durante la exposición a Cd, mientras que el extracelular es tóxico

Igualmente se ha demostrado que al aplicar concentraciones diversas de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>) a ratas antes o durante la gestación, se aumenta la movilización hepática tanto del Cd como de la metalotioneína hacia el riñón produciendo signos de nefropatía. Estos estudios concuerdan en indicar que el embarazo es un factor de alto riesgo, con respecto a la nefrotoxicidad en mujeres con exposición crónica de Cd (Riordan y Richards 1980, Gallant y Cherian 1987, Chan y

Cherian 1993a,b).

En estudios de respuesta al tratamiento de carcinoma, se ha encontrado que la MT ejerce un efecto protector contra las radiaciones, algunos radicales libres y agentes quimioterapéuticos. En diferentes estudios realizados con células tumorales resistentes a diversos compuestos, como el Cis-diaminocloroplatino, se describe un contenido alto de MT, así como la presencia de resistencia cruzada con otras drogas antineoplásicas como el clorambucil, el melfalan, etc. La histología de estos tumores ha revelado que la mayoría del platino, así como el clorambucil (entre 20 y 40 %) parecen estar asociados con la MT intracelular, observando la expresión de esta proteína, tanto en núcleo como en el citoplasma a diferentes concentraciones, por lo que la síntesis de la MT en las células cancerosas se ha venido proponiendo como un posible mecanismo para la inactivación a nivel intracelular de ciertos compuestos terapéuticos (Chung *et al.* 1986, Nartey y Cherian 1987, Douglas *et al.* 1991, Srivastava *et al.* 1995).

**TABLA II.** PRINCIPALES ESPECIES UTILIZADAS PARA PURIFICAR Y CUANTIFICAR METALOTIONEÍNAS

Especie	Purificación	Cuantificación	Referencia
Planta: <i>Arabidopsis thaliana</i>	FG-A	ELISA	Murphy <i>et al.</i> (1997)
Humano: hígado y riñón	FG	EAA, MSAg	Chung <i>et al.</i> (1986), Torra <i>et al.</i> (1994)
Puerco: hígado y riñón	II,HPLC-FR	-	Groten <i>et al.</i> (1992)
Bovino: células endoteliales	-	MSAg	Kaji <i>et al.</i> (1995, 1996)
Caballo: riñón	Precipitación-Dialisis	Titulación	Kägi y Vallee (1960)
Ratón: hígado (hembra adulta)	-	MSAg	Srivastava <i>et al.</i> (1995)
Rata: hígado, riñón, plasma, intestino, pancreas (feto, neonato, rata preñada, adulta)	HPLC-FG-IA; HPLC-FG-II; II-HPLC-FG ;FG ;HPLC-IA; II; HPLC;FG-II	RI,EAA,HPLC-MSAg; Polarografía;ELISA MSAg-ELISA; HPLC-EAA; EAA; MSCd; MSCd-Polarografía	Oh <i>et al.</i> (1978), Banerjee <i>et al.</i> (1982), Onosaka <i>et al.</i> (1982), Onosaka y Cherian (1984), Suzuki <i>et al.</i> (1985), Lehman y Klaassen (1986), Scheuhammer y Cherian (1986), Gallant y Cherian (1987), Ohta <i>et al.</i> (1989), Evering <i>et al.</i> (1991), Chan <i>et al.</i> (1992), Chan y Cherian (1993a, b), Groten <i>et al.</i> (1992), Jin <i>et al.</i> (1993), Pan <i>et al.</i> (1993), Masters <i>et al.</i> (1994), Quaiñe <i>et al.</i> (1994), Miyairi <i>et al.</i> (1998)
Molusco ( <i>Dreissena polymorpha</i> , <i>Mytilus edulis</i> , <i>Helix pomatia</i> )	HPLC-FG ; IA; FG-II	HPLC-EAA-EM	Viarengo <i>et al.</i> (1984), Dallinger <i>et al.</i> (1993), Mackay <i>et al.</i> (1993), Tessier y Blais (1996)
Estrella de mar: <i>Echinodermada</i>	FG	Polarografía	Temara <i>et al.</i> (1997)
Caballito de mar: huevo (Paracentrotus lividus)	FG-IA	MSAg	Scudiero <i>et al.</i> (1995)
Cangrejo: hepatopancreas ( <i>Carcinus maenas L.</i> y <i>Chionecetes bairdi</i> )	HPLC-FG-FR; HPLC-FG	Polarografía	Thompson y Sutherland (1992), Pedersen <i>et al.</i> (1994)
Tortuga: hígado ( <i>Trachemys script</i> )	FG y HPLC-FR	EAA	Thomas <i>et al.</i> (1994)
Almeja ( <i>Ruditapes decussata</i> )	FG	Polarografía	Bebianno <i>et al.</i> (1994)
Trucha arcoiris ( <i>Salmo gairdneri</i> )	FG - II	MSAg	Hao <i>et al.</i> (1993)
Ostión: Embrión ( <i>Crassostrea virginica</i> y <i>Crassostrea gigas</i> )	HPLC-FG-IA; HPLC-IA; FG	EAA; Polarografía	Imber <i>et al.</i> (1987), Ringwood y Huffman (1992)
Langosta ( <i>Homarus americanus</i> )	FG; FG-IA	EAA, polarografía	Chou <i>et al.</i> (1993), Ringwood <i>et al.</i> (1995)
Pez dorado: hígado, riñón ( <i>Carassius auratus L.</i> )	FG; II-FG	EAA	Carpené y Vasák (1989), Carpené <i>et al.</i> (1992)
Cianobacterias	HPLC- FR	Polarografía	Olafson (1986)

FG: filtración gel; FG-A: filtración gel por afinidad por Cu y grupos tiol; EAA: espectroscopía de absorción atómica; MSAg: método de saturación con plata; II: intercambio iónico; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; FR: fase reversa; F: fluorescencia, IA: intercambio aniónico; RI: radioinmunoensayo; MSCd: método de saturación con cadmio; EM: espectroscopía de masas

### Principales métodos para purificar y cuantificar metalotioneínas

Como se puede observar en la **tabla II**, se han utilizado diversos métodos para el aislamiento, la purificación y la cuantificación de metalotioneínas en gran variedad de tejidos y especies. Para la extracción de estas proteínas, los amortiguadores más utilizados han sido el fosfato salino 50 mM a pH de 7.4 (Kägi y Vallee 1960, Chan *et al.* 1992) y en particular el TRIS-HCl en un rango de concentraciones entre 10 y 50 mM y pH de 8.6 (Imber *et al.* 1987, Carpené y Vasák 1989, Ohta *et al.* 1989, Carpené *et al.* 1992, Thompson y Sutherland 1992 y Hao *et al.* 1993). Por otra parte, para su aislamiento y purificación se han utilizado técnicas de cromatografía de baja presión como filtración en gel seguida por intercambio iónico o por cromatografía de afinidad por Cu, grupos tioles o bien por técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de intercambio iónico y/o fase reversa (Carpené y Vasák 1989, Chou *et al.* 1993, Torra *et al.* 1994, Scudiero *et al.* 1995, Srivastava *et al.* 1995, Murphy *et al.* 1997).

Para la cuantificación de las metalotioneínas se ha utilizado la saturación con metales pesados como Cd, Cu, Ag y Ag radioactiva. Este método se basa en la capacidad alta de estos metales por enlazar a la proteína (Onosaka *et al.* 1984, Chung *et al.* 1986, Kaji *et al.* 1995). Otra forma de cuantificación ha sido determinando la concentración de Cd en la fracción de elusión de la proteína por espectroscopía de absorción atómica (EAA) asumiendo una relación de 7.5 átomos de Cd por molécula de MT (Lehman y Klaassen 1986, Carpené *et al.* 1992, Chou *et al.* 1993). También, la polarografía diferencial por pulso es otro de los métodos utilizados para la cuantificación de MT, esta técnica se basa en la medición de los grupos tioles presentes en estas proteínas. Este es un método sensible en el cual el límite de detección es 10 µg/L (Onosaka y Cherian 1982, Thompson y Cosson 1984, Olafson 1986, Imber *et al.* 1987, Thompson y Sutherland 1992, Bebianno *et al.* 1994). Los métodos indirectos más sensibles que se han utilizado son el radioinmunoensayo y el de ELISA en donde los límites de detección se encuentran en el orden de los picogramos (Mehra y Bremner 1983, Chan *et al.* 1992, Murphy *et al.* 1997).

### Niveles de cadmio en tejidos de mamíferos

En 1992, se implementó en el estado de Sonora el programa de monitoreo de residuos tóxicos en carne y vísceras de animales destinados al consumo humano, en estos estudios se incluyeron los metales pesados. Por medio de este programa se ha establecido la incidencia de estos metales así como su concentración promedio en bovinos, porcinos y aves (**Tabla III**). Se encontró que la concentración promedio de Cd en riñón es de 0.66 µg/g en bovino, 1.11 µg/g en porcino y de 3.85 µg/g en aves y la concentración de Cu en hígado es de 53.25, 12.31 y de 4.15 µg/g en bovino, porcino y aves, respectivamente (García-Rico y Jara-Marini 1996, García Rico *et al.* 1997).

Al comparar la concentración de Cd en riñón de aves (3.85 µg/g) con el indicado en la literatura que reporta un valor promedio de 0.09 µg/g en pollo y de 2.63 µg/g en gallina adulta (Doganoc 1996), se observó que el valor determinado en nuestro laboratorio esta muy por arriba de los citados en nutrición animal y como también en porcino se presenta un comportamiento similar, es necesario estudiar mas ampliamente las concentraciones de Cd y Cd-MT en estas especies.

Actualmente no existe una norma que especifique el nivel máximo de tolerancia para estos metales en carne y productos cárnicos. Sin embargo, algunos países como Canadá han definido niveles de acción en los cuales se deben basar las investigaciones para ayudar a los productores a identificar la fuente de contaminación y corregir los problemas que puedan poner en peligro la salud de los consumidores. Esos niveles de acción son (en µg/g de tejido fresco): 2 para arsénico, 1 para cadmio, 150 para cobre, 0.5 para mercurio, 2 para plomo y 100 para zinc (Salisbury *et al.* 1991).

### CONCLUSIONES

La principal función que se ha encontrado para las metalotioneínas es el mantenimiento de la homeostasis del Zn y Cu durante la gestación y en la edad temprana. Cuando se expone el organismo a metales pesados no esenciales como el Cd, se produce el desplazamiento de los elementos esenciales, for-

**TABLA III.** CONCENTRACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA EN ANIMALES DESTINADOS AL CONSUMO HUMANO (µg/g TEJIDO FRESCO)

Especie	Tejido	Cadmio <sup>a</sup>	Cobre <sup>a</sup>	Plomo <sup>a</sup>	Arsénico <sup>a</sup>	Mercurio <sup>a</sup>
Bovino	Hígado	0.27 ± 0.19	53.25 ± 45.17	0.67 ± 0.53	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.02
	Riñón	0.66 ± 1.18	3.84 ± 1.31	0.52 ± 0.25	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.03
	Músculo	0.18 ± 0.15	1.19 ± 0.60	0.43 ± 0.21	0.03 ± 0.04	0.02 ± 0.01
Porcino	Hígado	0.35 ± 0.16	12.31 ± 15.19	0.41 ± 0.36	0.03 ± 0.10	0.01 ± 0.01
	Riñón	1.11 ± 1.00	7.72 ± 4.03	0.25 ± 0.17	0.03 ± 0.03	0.02 ± 0.02
	Músculo	0.29 ± 0.14	0.75 ± 0.58	0.32 ± 0.11	0.03 ± 0.08	0.02 ± 0.01
Aves	Hígado	0.78 ± 0.86	4.15 ± 1.31	0.46 ± 0.26	0.07 ± 0.29	0.03 ± 0.03
	Riñón	3.85 ± 3.85	2.88 ± 1.89	0.36 ± 0.33	0.04 ± 0.15	0.03 ± 0.03
	Músculo	0.44 ± 0.10	0.56 ± 0.23	0.34 ± 0.33	0.04 ± 0.10	0.03 ± 0.01

a: media ± desviación estándar.

mando complejos Cd-MT nefrotóxicos. Esto llega a provocar daños tubulares de diferente magnitud, dependiendo de la concentración del complejo tóxico, de la vía de entrada al organismo, así como de la especie, de la edad y del sexo, por lo que las investigaciones al respecto deben tener en cuenta estos factores para llegar a esclarecer el mecanismo mediante el cual se produce el efecto desintoxicador de esta proteína.

## REFERENCIAS

- Andrews G. K., Fernando L.P., Moore K.L., Dalton T.P. y Sobieski R.J. (1996). Avian metallothioneins: structure, regulation and evolution. *American Institute of Nutrition* 1317s-1323s.
- Binz P.A. y Kägi J. (1997). Molecular evolution of metallothioneins: contributions from coding and non-coding regions. Second European Meeting of the Protein Society, Cambridge (UK), Institute of Biochemistry of the University of Zurich.
- Banerjee D., Onosaka S. y Cherian M.G. (1982). Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of rat liver and kidney. *Toxicology* 24, 95-105.
- Bebiano M.J., Serafim M.A.P. y Rita M.F. (1994). Involvement of metallothionein in cadmium accumulation and elimination in the clam *Ruditapes decussata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 726-732.
- Brugnera E., Georgiev O., Radtke F., Heuchel R., Baker E., Sutherland G.R. y Schaffner W. (1994). Cloning, chromosomal mapping and characterization of the human metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res.* 22, 3167-3173.
- Butt T.R., Sternberg E.J., Mirabelli C.K. y Crooke S.T. (1986). Regulation of metallothionein gene expression in mammalian cells by gold compounds. *Molec. Pharmacol.* 29, 204-210.
- Carpené E. y Vasák M. (1989). Hepatic metallothioneins from goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 92B, 463-468.
- Carpené E., Camatti A., Isani G., Cattani O. y Cortesi P. (1992). Cd-metallothionein in liver and kidney of goldfish (*Carassius auratus*): effects of temperature and salinity. *Italian J. Biochem.* 41, 273-282.
- Chan H.M., Cherian M.G. y Bremner I. (1992). Quantification of metallothionein isoforms using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with two specific antisera. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 116, 267-270.
- Chan H.M. y Cherian M.G. (1993a). Ontogenic changes in hepatic metallothionein isoforms in prenatal and newborn rats. *Biochem. Cell. Biol.* 71, 133-140.
- Chan H.M. y Cherian M.G. (1993b). Mobilization of hepatic cadmium in pregnant rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120, 308-314.
- Cherian M.G. y Goyer R.A. (1978). Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci.* 23, 1-10.
- Cherian M.G. (1989). Metallothionein in mineral metabolism and mammalian development. En: *Metabolism of minerals and trace elements in human disease* (E. M. Abdulla, Ed.), Smith-Gordon, Ontario, pp. 203-209.
- Chou C.L., Uthe J.F. y Guy R. D. (1993). Determination of free and bound Cd, Zn, Cu, and Ag ions in lobster (*Homarus americanus*) digestive gland extracts by gel chromatography followed by atomic absorption spectrophotometry and polarography. *J. AOAC Internat.* 76, 794-797.
- Chung I., Nartey N. y Cherian M.G. (1986). Metallothionein levels in liver and kidney of Canadians. A potential indicator of environmental exposure to cadmium. *Arch. Environ. Health.* 41, 319-323.
- Coupe S.A., Taylor J.F. y Roberts J.A. (1995). Characterization of mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted abscission of *Sambucus nigra* leaflets. *Planta.* 197, 442-447.
- Dallinger R., Berger B., Hunziker P.E., Birchler N., Hauer C.R. y Kägi J.H. (1993). Purification and primary structure of snail metallothionein. Similarity of the N-terminal sequence with histones H4 and H2A. *Eur. J. Biochem.* 216, 739-746.
- Doganoc D.Z. (1996). Distribution of lead, cadmium, and zinc in tissues of hens and chickens from Slovenia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 932-937.
- Douglas M., Templeton D. y Cherian M.G. (1991). Toxicological significance of metallothionein. En: *Methods in Enzymology*. Vol. 205 (J. Riordan y B. Valle, Eds.) Academic Press, San Diego.
- Evering W.E., Haywood S., Bremner I. y Trafford J. (1991). The protective role of metallothionein in copper overload. I. Differential distribution of immunoreactive metallothionein in copper-loaded rat liver and kidney. *Chem. Biol. Interact.* 78, 283-295.
- Florence T., Morrison G. y Stauber J. (1992). Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity. *Sci. Total Environ.* 125, 1-3.
- Foley R.C., Liang Z.M. y Singh K. B. (1997). Analysis of type I metallothionein cDNAs in *Vicia faba*. *Plant Mol. Biol.* 33, 583-591.
- Freedman J.H., Slice L.W., Dixon D., Fires A. y Rubin C.S. (1993). The novel metallothionein genes of *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 268, 2554-2564.
- Gallant K.R. y Cherian M.G. (1987). Changes in dietary zinc result in specific alterations of metallothionein concentrations in newborn rat liver. *J. Nutr.* 117, 709-716.
- García-Rico L. y Jara-Marini M. (1996). Aplicación de microondas en la digestión de hígado de bovino para la cuantificación de metales pesados. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 12, 40-44.
- García-Rico L., Jara M.M., Bermúdez A.C. y Vázquez M.L. (1997). Monitoring of trace elements in slaughter animals produced in Sonora, México. 111<sup>th</sup> AOAC International Annual Meeting and Exposition. San Diego, California.
- Groten J.P., Hissink E. y van-Bladeren P.J. (1992). Differences in chromatographic behavior of rat and pig metallothionein isoforms: a possible method of distinguishing between exogenous and endogenous metallothioneins. *IARC. Sci. Publ. ISS.* 118, 219-224.
- Hamer D.H. (1986). Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 913-951.
- Hao R., Pfeiffer R. y Ebadi M. (1993). Purification and characterization of metallothionein and its activation of pyridoxal phosphokinase

- in trout (*Salmo gairdneri*) brain. *Comp. Biochem. Physiol.* **104B**, 293-298.
- Imber B.E., Thompson J.A.J. y Ward S. (1987). Metal-binding protein in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: assessment of the protein as a biochemical environmental indicator. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **38**, 707-714.
- Jin N., Kimura M., Yokoi K. e Itokawa Y. (1993). A gel filtration high-performance liquid chromatographic method for determination of hepatic and renal metallothionein of rat and in comparison with the cadmium-saturation method. *Biol. Trace Elem. Res.* **36**, 183-190.
- Kägi J.H.R. y Vallee B.L. (1960). Metallothionein: a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* **235**, 3460-3465.
- Kägi J. y Kojima Y. (1987). Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Suppl.* **52**, 25-61.
- Kaji T., Mishima A., Machida M., Yabusaki K., Suzuki M., Yamamoto C., Fujiwara Y., Sakamoto M. y Kosuka H. (1995). Comparative cytotoxicity of exogenous cadmium-metallothionein and cadmium ion in cultured vascular endothelial cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **54**, 501-506.
- Kaji T., Mishima A., Yamamoto C., Fujiwara Y., Sakamoto M., Kozuka H. y Koizumi F. (1996). Bismuth induces metallothionein but does not protect against cadmium cytotoxicity in cultured vascular endothelial cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**, 630-634.
- Karin M. y Richards R.I. (1984). The human metallothionein gene family: structure and expression. *Environ. Health Perspect.* **54**, 111-115.
- Kojima Y. (1991). Definitions and nomenclature of metallothioneins. En: *Methods in Enzymology* (E. J. Riordan y B. Valle, Eds.). Vol. **205**, American Press, San Diego.
- Le Beau M.M., Diaz M.O., Karin M. y Rowley J.D. (1985). Metallothionein gene cluster is split by chromosome 16 rearrangements in myelomonocytic leukaemia. *Nature* **313**, 709-711.
- Lehman L.D. y Klaassen C.D. (1986). Separation and quantitation of metallothioneins by high-performance liquid chromatography coupled with atomic absorption spectrophotometry. *Analyt. Biochem.* **153**, 305-314.
- Mackay E.A., Overnell J., Dunbar B., Davidson I., Hunziker P.E., Kägi J.H. y Fothergill J.E. (1993). Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothioneins from the edible mussel *Mytilus edulis*. *Eur. J. Biochem.* **218**, 183-194.
- Margoshes M. y Vallee B.L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4813-4814.
- Masters B.A., Kelly E.J., Quaife C.J., Brinster R.L. y Palmiter D. (1994). Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **91**, 584-588.
- Mehra R.K. y Bremner I. (1983). Development of a radioimmunoassay for rat liver metallothionein-I and its application to the analysis of rat plasma and kidneys. *J. Biochem.* **213**, 459-465.
- Miyairi S., Shibata S. y Naganuma A. (1998). Determination of metallothionein by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using an isocratic solvent system. *Analyt. Biochem.* **258**, 168-175.
- Murphy A., Zhou J., Goldsbrough P. y Biz L. (1997). Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **113**, 1293-1301.
- Nartey N. y Cherian M.G. (1987). Immunohistochemical localization of metallothionein in human thyroid tumors. *Am. J. Pathol.* **129**, 177-182.
- Oh S.H., Deagen J.T., Whanger P.D. y Weswig P.H. (1978). Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by various stresses. *Am. Physiol. Sci.* **234**, E282-E285.
- Ohta H., DeAngelis M., y Cherian M.G. (1989). Uptake of cadmium and metallothionein by rat everted intestinal sacs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **101**, 62-69.
- Olafson R.W. (1986). Physiological and chemical characterization of cyanobacterial metallothioneins. *Environ. Health Perspect.* **65**, 71-75.
- Onosaka S. y Cherian M.G. (1982). Comparison of metallothionein determination by polarographic and cadmium-saturation methods. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **63**, 270-274.
- Onosaka S., Tanaka K. y Cherian M.G. (1984). Effects of cadmium and zinc on tissue levels of metallothionein. *Environ. Health Perspect.* **54**, 67-72.
- Pan A., Tie F., Yang M., Luo J., Wang Z., Ding X., Li L., Chen Z. y Ru B. (1993). Construction of multiple copy of alpha-domain gene fragment of human liver metallothionein IA in tandem arrays and its expression in transgenic tobacco plants. *Protein Eng.* **6**, 755-762.
- Pedersen K.L., Pedersen S.N., Hojrup P., Andersen J.S., Roepstorff P., Knudsen J. y Depledge M.H. (1994). Purification and characterization of a cadmium-induced metallothionein from the shore crab *Carcinus maenas* (L.) *Biochem. J.* **297**, 609-614.
- Quaife C.J., Findley S.D., Erickson J.C., Froelick G.J., Kelly E.J., Zambrowicz B.P. y Palmiter R.D. (1994). Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochem.* **33**, 7250-7259.
- Reilly C. (1980). *Metal contamination of foods*. Applied Science Publishers, Essex, pp. 3-14.
- Richards R.I., Heguy A. y Karin M. (1984). Structural and functional analysis of the human metallothionein-I<sub>A</sub> gene: differential induction by metal ions and glucocorticoids. *Cell* **37**, 263-272.
- Ringwood A. y Huffman H. (1992). Bivalve development and variation in metallothionein expression during metal exposures. *Environ. Health Perspect.* **100**, 4-7.
- Ringwood A., Brouwer M., Forlin L. y Andersson T. (1995). Patterns of metallothionein expression in oyster embryos. *Mar. Environ. Res.* **39**, 101-105.
- Riordan J.R. y Richards V. (1980). Human fetal liver contains both zinc-and copper-rich forms of metallothionein. *J. Biol. Chem.* **255**, 5380-5383.
- Salisbury C.D., Chan W. y Saschenbrecker P.W. (1991). Multielement concentrations in liver and kidney tissues from five species of canadian slaughter animals. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* **74**, 587-591.

- Scheuhammer A.M. y Cherian M.G. (1986). Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *82*, 417-425.
- Scudiero R., Capasso C., Del Vecchio-Blanco F., Savino G., Capasso A., Parente A. y Parisi E. (1995). Isolation and primary structure determination of a metallothionein from *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Comp. Biochem. Physiol.* *111B*, 329-336.
- Searle P.F., Davison B.L., Stuart G.W., Wilkie T.M., Norstedt G. y Palmiter R.D. (1984) Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein I and II genes. *Molec. Cell. Biol.* *4*, 1221-1230.
- Srivastava R.C., Husain M.M., Srivastava S.K., Hasan S.K. y Lal A. (1995). Effect of pre-exposure to cadmium and silver on nickel induced toxic manifestation in mice: possible role of ceruloplasmin and metallothionein. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *54*, 751-759.
- Stuart G.W., Searle P.F. y Palmiter R. D. (1985). Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. *Nature* *317*, 828-831.
- Suzuki K.T., Uehara H., Sunaga H. y Shimajo N. (1985). Induction and detection of a third isometallothionein (metallothionein-II) in rat liver. *Toxicol. Lett.* *24*, 15-20.
- Temara A., Warnau M., Dubois P. y Langston W.J. (1997). Quantification of metallothioneins in the common asteriod *Asterias rubens* (Echinodermata) exposed experimentally or naturally to cadmium. *Aquat. Toxicol.* *38*, 17-34.
- Tessier C. y Blais J.S. (1996). Determination of cadmium-metallothioneins in zebra mussels exposed to subchronic concentrations of Cd super (2+). *Ecotoxicol. Environ. Safe.* *33*, 246-252.
- Thomas P., Baer K.N. y White R. B. (1994). Isolation and partial characterization of metallothionein in the liver of the red-eared turtle (*Trachemys scripta*) following intraperitoneal administration of cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.* *107C* 221-226.
- Thompson J.A.J. y Cosson R. P. (1984). An improved electrochemical method for the quantification of metallothioneins in marine organisms. *Marine Environ. Res.* *11*, 137-152.
- Thompson J.A.J. y Sutherland A.E. (1992). A comparison of methods for sample clean-up prior to quantification of metal-binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* *102B*, 769-772.
- Torra M., To-Figueras J., Brunet M., Rodamilans M. y Corbella J. (1994). Total and metallothionein-bound cadmium in the liver and the kidney of a population in Barcelona (Spain). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *53*, 509-515.
- Vallee B.L. (1991). Introduction to metallothionein. En: *Methods in Enzymology* (E. J. Riordan y B. Valle, Eds.) Vol. *205*. Academic Press, San Diego.
- Viarengo A., Pertica M., Mancinelli G., Zanicchi G. y Bouquegneau J.M. (1984). Biochemical characterization of copper-thioneins isolated from the tissues of mussels exposed to the metal. *Molec. Physiol.* *5*, 41-52.
- Webb M. y Cain K. (1982). Functions of metallothionein. *Biochem. Pharmacol.* *31*, 137-143.
- Winge D.R., Nielson K.B., Zeikus R.D. y Gray W.R. (1984). Structural characterization of the isoforms of neonatal and adult rat liver metallothionein. *J. Biol. Chem.* *259*, 11419-11425.
- Zhou J y Goldsbrough B. (1995). Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Molec. Gen. Genet.* *248*, 318-328.