

Purificación parcial y actividad biológica de la metalotioneína hepática

M. P. Iniesta, B. Ribas *, S. Bondia, M. T. Peláez **, J. V. Beneit ** y P. Lorenzo **

Instituto de Bioquímica
Centro Mixto C.S.I.C. — Universidad Complutense
Facultad de Farmacia
28040 Madrid (España)

(Recibido el 22 de octubre de 1984)

M. P. INIESTA, B. RIBAS, S. BONDIA, M. T. PELAEZ, J. V. BENEIT and P. LORENZO.
Partial Purification of Hepatic Metallothionein and Biological Activity. Rev. esp. Fisiol.,
41, 431-436. 1985.

The hepatic metallothionein was isolated and partially purified from rats treated previously with stable Cl_2Cd and $\text{Cl}_2\text{Cd}^{109}$. The livers were subjected to the extraction of proteins of low relative molecular weight by heat, ammonium sulphate, Sephadex G-25 and Sephadex G-75. The partially purified extracts were subjected to the pharmacological activity test on isolated mouse vas deferens. A specific effect on the norepinephrine synapsis was obtained through an increment of the answer to the electric stimulus. The mechanism of action could be explained by the increase of the calcium permeability through the membrane or by the increment of the norepinephrine presynaptic release.

Key words: Biological activity, Hepatic metallothionein.

El significado del cadmio en los seres vivos ha sido estudiado por varios autores (11, 12). MARGOSHES y VALLEE aislaron por primera vez la metalotioneína de corteza de riñón de caballo, que contiene además de cadmio, zinc y, en menor cuantía, cobre y hierro. PISCATOR atribuye a la metalotioneína una importante función en la detoxificación de metales (12) y PULIDO *et al.* (15) describen esta proteína en riñón de seres humanos

asociando, además de cadmio, zinc, cobre y mercurio. Esta proteína se caracteriza por tener una masa molecular entre 6000 y 7000, y por filtración sobre gel 10.000 daltones, y comportarse como una esfera (7, 8); se le atribuye un alto contenido en metales, no poseer ningún aminoácido aromático y presentar una elevada composición en cisteína. Presenta propiedades ópticas características de los grupos «mercáptidos». Recientemente se han encontrado varias isoformas moleculares de esta proteína (16, 17).

El objeto de este trabajo consiste en obtener la metalotioneína purificada, conocer su polimorfismo y actividad biológica específica, para un posterior estudio

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

** Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

de su función y el aislamiento de cada una de sus formas moleculares.

Material y Métodos

Aislamiento de proteínas. Se utilizan cuatro grupos de diez ratas macho de raza Wistar de aproximadamente 240 g alimentadas con dieta estándar de pienso compuesto y agua *ad libitum*, dos para inyectar cadmio y los dos restantes como controles. Se administra por vía i.p. diariamente, y hasta un total de 15 inyecciones, dosis de 1 mg Cd/kg rata, de una solución de Cl_2Cd , y en las últimas 3 inyecciones se añaden en cada dosis 2 μCi de Cl_2Cd -109. La administración del radionucleido se realiza a uno de los dos grupos, con el fin de poder realizar experimentos paralelos con extractos estables y radiactivos. Ello permite utilizar técnicas con aparatos que no deben contaminarse.

Los hígados obtenidos por disección, tras ser pesados, se someten a extracción y purificación según trabajos anteriores (3). Se recogen fracciones por medio del sistema Uvicord-Colelector de fracciones (LKB) y las obtenidas correspondientes al pico radiactivo de proteínas marcadas con cadmio-109 se reúnen, desalifican y liofilizan, ajustándose al título proteico de 3,2 mg proteína/ 16×10^3 cpm/ml.

Los extractos obtenidos paralelamente de hígados con cadmio estable y control contienen las moléculas de bajo peso molecular igual que la fracción problema, pero sin marcar con el radionucleido, y se ajustan al mismo título proteico.

Actividad farmacológica. Los conductos deferentes aislados de ratones albinos colocados en una placa de Petri con disolución Krebs a temperatura ambiente, se limpian y se separan las vainas de tejido conectivo que los envuelve (5, 18). Libres de adherencias se anudan y montan en baño de órganos, con copa de

20 ml y dos electrodos de platino-iridio verticales; se hace llegar una disolución Krebs de composición mM: ClNa 118; KCl 4,75; MgSO_4 1,2; CaCl_2 2,5; KH_2PO_4 1,19; NaHCO_3 25 y glucosa 5,5, por perfusión continua a un ritmo de 60 gotas/min, gaseada con mezcla carbógena (95 % O_2 y 5 % CO_2) a 35°C de temperatura (1).

Los estímulos se proporcionan mediante trenes de pulsos (de 3 a 25) de 80 mV, duración 1 ms, frecuencia 15 Hz y a intervalos de 1 min; se registran las concentraciones mediante un transductor de fuerza-desplazamiento a un polígrafo Grass FTO3. El extracto que contiene la proteína en estudio se administra por perfusión continua.

Resultados

En los experimentos realizados para controlar los pesos de los diferentes grupos de animales, se observan las variaciones del peso total y del peso de los distintos órganos de animales tratados con cadmio, expresados en % respecto a los controles. El peso total de los animales controles dado que están en crecimiento aumenta progresivamente a medida que avanza el experimento y el peso total de las ratas tratadas con cadmio aumenta con lentitud (— 30 %). El pulmón es el único órgano que experimenta decremento (— 45 %). El resto de los órganos estudiados experimenta aumento de peso: hígado + 30 %, riñones + 20 %, páncreas + 10 %, testículos + 5 %, bazo + 50 %, cerebro + 35 %. El aumento de proteínas hepáticas y renales de animales tratados con cadmio y siempre referido a animales control es del + 38 % y + 5 %, respectivamente.

Al someter el extracto hepático a la purificación por precipitación fraccionada con sulfato amónico a distintas concentraciones (40, 60, 80 y 100 %) se obtuvieron cuatro fracciones proteicas, cuyas

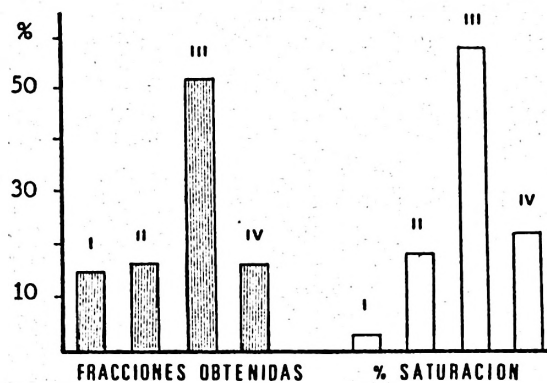


Fig. 1. Purificación fraccionada de proteínas de baja masa molecular con sulfato amónico. Las barras rayadas representan los porcentajes de proteína de partida y las blancas los porcentajes de proteína precipitada en radionucleico Cd-109. Las fracciones I, II, III y IV se obtienen por precipitación fraccionada con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ a 40, 60, 80 y 100 % respectivamente.

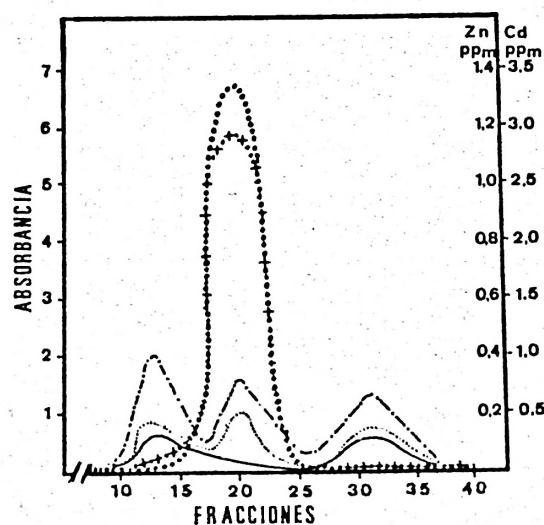


Fig. 2. Purificación del extracto proteico inducido con cadmio estable en columna de Sephadex G-50 (30×2 cm) con tampón fosfato 0,1 M, pH = 7,2 y flujo de 8 ml/h. La fracción proteica de metalotioneína es filtrada en la fracción n.º 20 con mayores concentraciones de zinc y cadmio. ... Cd; --- Zn por espectrofotometría de absorción atómica; --- 250 nm; ... 215 nm y — 280 nm.

proteínas se determinaron por los métodos de HARTREE (6) y LOWRY (9). La proteína objeto de estudio precipita en todas las fracciones obtenidas, con un porcentaje mayor en la fracción III, que corresponde a una concentración del 80 % de sulfato amónico (fig. 1).

La fracción mayoritaria de la metalproteína a través de una columna de Sephadex G-50 (30×2 cm) con tampón fosfato 0,1 M, pH = 7,2 es eluida en la fracción 20 y se corresponde con las mayores concentraciones de Zn y Cd, elementos asociados por aquélla. La fracción 20 muestra absorción en el ultravioleta a las longitudes de onda de 250 y 215 nm. A 280 nm, la metalproteína hepática tiene una reducida absorción (figura 2), lo que indica que carece de aminoácidos aromáticos y corrobora anteriores resultados (3).

Las determinaciones de Zn y Cd por espectrofotometría de absorción atómica se realizaron en extractos paralelos de hígado de ratas tratadas con Cd estable y sometidas al mismo tiempo al proceso de extracción.

Los tres picos de proteínas obtenidos en la separación por filtración a través de Sephadex G-50, de 215, 250 y 280 nm corresponden a proteínas de elevada masa molecular relativa, metalproteína y otras

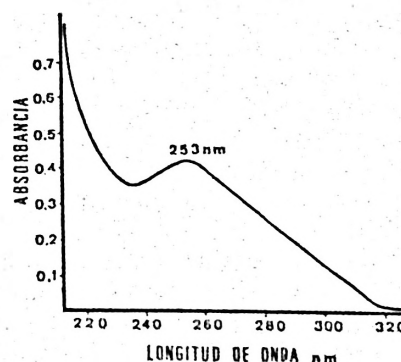


Fig. 3. Espectro ultravioleta del extracto de metalotioneína hepática purificada. Presenta un máximo en 253 nm en tampón formiato amónico 0,01 M pH = 7,4.

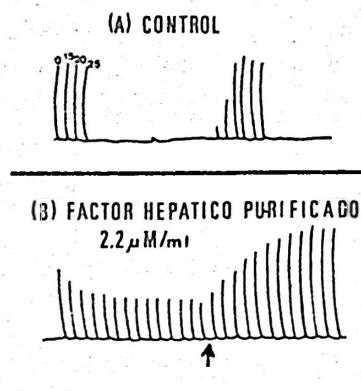


Fig. 4. Actividad farmacológica del extracto purificado de metalotioneína hepática.

(A): gráfica control con trenes de pulsos de 3 a 25 y 80 mV, frecuencia 15 Hz, duración 1 ms. (B): respuesta contráctil antes y después de la administración, en el lugar de la flecha, del factor hepático proteico de bajo peso molecular aislado y purificado.

proteínas de bajo peso molecular o péptidos y aminoácidos, respectivamente.

El extracto purificado de la metalproteína obtenida después de un paso posterior por Sephadex G-75 ($40 \times 2,7$ cm), utilizando tampón formiato amónico 0,01 M, pH = 7,4, da un máximo en su espectro de absorción molecular a 253 nm (figura 3).

En la figura 4 se representa el gráfico control obtenido en polígrafo con trenes de pulsos de 3 a 25 y 80 mV con una duración de 1 ms, frecuencia 15 Hz y a intervalos de 1 min.

La figura 4 (B) muestra la respuesta contráctil antes y después de la administración por perfusión continua del factor hepático aislado a la concentración de $2,2 \mu\text{M/ml}$.

El pico obtenido del extracto paralelo, inducido con cadmio-109 y aplicada la técnica de aislamiento (3) se sometió a electroforesis en gel de poliácridamida y proporcionó una sola banda radiactiva, indicativa de la existencia de una proteína parcialmente purificada radiactiva, que liga átomos de cadmio radionucleido.

Discusión

La exposición de ratas al efecto del cadmio induce de forma variable el incremento de peso de algunos órganos. Este aumento está en relación con la concentración de metalotioneína, pero no depende directamente de ella, sino del edema y fibrosis que acompaña al trastorno patológico. Las concentraciones de metalotioneína en diferentes órganos se mantienen aún después de suprimir la exposición al Cd (4, 14, 19), datos corroborados por el aumento de concentración de Zn y Cd en órganos, metales mayoritarios en la metalotioneína. El hígado y riñón son los órganos que muestran mayor concentración de metalotioneína con Cd (13, 15, 21). Se encuentra un aumento de peso estadísticamente significativo en los órganos sistémicos de las ratas tratadas con Cd, que oscila entre el 22 y el 50 % respecto a los controles y también un incremento de su concentración proteica, si bien, sólo se observa significativo el aumento de peso de hígado, por la gran variación de la respuesta individual.

La disminución de peso del pulmón respecto a controles puede justificarse por la respuesta homeostática del organismo a la presencia del Cd, a sus propiedades físico-químicas de bloquear ciertas proteínas a las que se une por ser un elemento de reducido reciclaje, y a sus efectos tóxicos (2).

El extracto proteico que se utiliza para la aplicación farmacológica ha sido purificado del contenido salino a través de columnas de Sephadex PD-10. Se eliminan numerosas proteínas durante la técnica de extracción y purificación mediante precipitación por calor y por sulfato amónico y principalmente en los pasos finales con Sephadex G-50 y G-75. A partir de la fracción más representativa, correspondiente al pico de baja masa molecular relativa recogida de la columna de Sephadex G-75, se obtiene un espec-

tro con un máximo de metalproteína correspondiente a 253 nm, que muestra la pureza de la muestra. La electroforesis sobre gel de poliacrilamida proporciona un solo pico de proteína, metalotioneína. El extracto obtenido por liofilización de las fracciones correspondientes a la metalotioneína eluidas del Sephadex G-75, se somete a los experimentos de actividad farmacológica.

Se descarta que el pico radiactivo obtenido, que corresponde a un péptido de bajo peso molecular, pueda representar un fragmento o rotura de una metalproteína u otro péptido precursor, como si procediera de un artefacto por toxicidad o sobrecarga de un metal pesado. Probablemente, se trata de un péptido nativo y el experimento representa un paso previo a un estudio más detallado sobre la actividad farmacológica de la metalotioneína. En el caso de que la administración de iones de un metal pesado indujera rotura de moléculas proteicas, muy probablemente se detectarían otras moléculas de variados pesos moleculares, seguramente artefactos, y una radiactividad difusa, en las fracciones recogidas de las sucesivas columnas de Sephadex realizadas.

Los resultados experimentales sugieren la presencia en los extractos purificados de hígado de ratas tratadas con Cd, de un factor proteico hepático de bajo peso molecular con una neta y efectiva actividad farmacológica, demostrada en la sinapsis noradrenérgica del conducto deferente de ratón. En el caso de que esta proteína aislada fuese la metalotioneína (20) se la podría considerar como una proteína reguladora del metabolismo y no como proteína específica de un determinado metal, con un significado biológico y regulador más amplio y en relación con la membrana celular y con sus funciones.

El mecanismo de acción del efecto biológico hallado en la sinapsis noradrenérgica, podría explicarse, bien a través del aumento de liberación presináptica de no-

radrenalina, o bien por un aumento de la permeabilidad de la membrana post-sináptica para el calcio. Estas dos hipótesis son discutidas actualmente en nuestro grupo de trabajo, teórica y experimentalmente. La actividad biológica del extracto estudiado corresponde haciendo un posible parangón con el de la metalotioneína, al conjunto de las isoformas de metalproteína (17), y de un extracto proteico hepático acuoso, de pH neutro, termoestable y de bajo peso molecular.

Agradecimientos

Agradecemos a la Fundación Alexander von Humboldt de la República Federal de Alemania, los aparatos donados al C.S.I.C. y a la Universidad española, sin cuya ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo. Este trabajo ha sido llevado a cabo en parte, gracias a la ayuda del C.S.I.C. n.º 608/226.

Resumen

Se aísla y purifica parcialmente una metalproteína hepática, posiblemente la metalotioneína hepática, a partir de hígado de ratas que han sido previamente tratadas con Cl_2Cd estable y con $\text{Cl}_2\text{Cd}^{109}$. El hígado se somete a extracción de proteínas de baja masa molecular relativa con calor, Sephadex G-25, sulfato amónico, Sephadex G-75 y los extractos parcialmente purificados se someten a pruebas de actividad farmacológica sobre conducto deferente aislado de ratones albinos. Se obtiene un efecto específico sobre la sinapsis noradrenérgica que se traduce por un aumento de la respuesta al estímulo eléctrico. El mecanismo de acción podría explicarse por un aumento de la permeabilidad de la membrana para el calcio o por el aumento de la liberación presináptica de noradrenalina.

Bibliografía

1. BENET, J. V., LORENZO, P. e HIDALGO, A.: *Rev. esp. Fisiol.*, **39**, 429-434, 1983.
2. BONDÍA, S.: Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 1982.

3. BONDÍA, S., RIBAS, B., DE LA TORRE, A. y SANTOS-RUIZ, A.: *Adv. Physiol. Sci.*, **12**, 71-75, 1980.
4. CEMPEL, M. y WEBB, M.: *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 2067-2071, 1976.
5. FERRY, C. B.: *J. Physiol.*, **192**, 463-478, 1967.
6. HARTREE, E. F.: *Analyt. Biochem.*, **48**, 422-427, 1972.
7. KAGI, J. H. R., HIMMELHOCH, S. R., WHANGER, P. D., BETHUNE, J. L. y VALLEE, B. L.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 3537-3542, 1974.
8. KOJIMA, Y., BERGER, C., VALLEE, B. L. y KAGI, J. H. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3413-3417, 1976.
9. LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. S.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
10. MALIUGA, D. P.: *Doklady Akad. Nauk. URRS*, **31**, 145-147, 1941.
11. MARGOSHES, M. y VALLEE, B. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813-4814, 1957.
12. PISCATOR, M.: *Nord. Hyg. Tidskr.*, **45**, 76-82, 1964.
13. PREMAKUMAR, R., WINGER, D. R., WILEY, R. D. y RASAGOPALAN, K. V.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 267-277, 1975.
14. PROBST, G. S., BOUSQUET, W. F. y MIYA, T. S.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **39**, 51-60, 1977.
15. PULIDO, P., KAGI, J. H. R. y VALLEE, B. L.: *Biochemistry*, **5**, 1768-1777, 1966.
16. RIBAS, B.: *An. Med.*, **67**, 941-953, 1981.
17. RIBAS, B.: Trace Elements. *Anal. Chem. Med. Biol.*, **2** (P. Brätter y P. Schramel, eds.). Walter de Gruyter Co., Berlin-Nueva York, 1983, 181-197.
18. SJOSTRAND, N. O.: *Acta Physiol. Scand.*, **65** (suppl.), 257, 1965.
19. SQUIBB, K. S. y COUSINS, R. J.: *Environm. Physiol. Biochem.*, **4**, 24-30, 1974.
20. VALLEE, B. L.: En «Metallothionein» (J. H. R. Kagi y M. Nordberg, eds.). Birkhauser Verlag, Basilea, 1979, 19-40.
21. VOINAR, A. O.: Mikroelementy i Zhini Rastanii i Zhivotnykh, Akad. Nauk, URRS. Trudy Konf. Mikroelement., 1950, 580-583.