

LAS METALOTIONEINAS Y EL ESTRÉS QUIRURGICO*

Elvia Harumi Scott López

RESUMEN

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas intracelulares de baja masa molecular (6 a 7 kDa) capaces de unir tanto metales esenciales como no esenciales. Contienen un alto contenido de grupos sulfhidrilo provenientes del aminoácido cisteína que constituyen el 33% de la molécula. Estudios *in vitro* han mostrado que estas proteínas son sintetizadas en respuesta a una gran variedad de estímulos fisiológicos y químicos, como son: hormonas, citocinas, especies reactivas de oxígeno, metales y de manera importante por estrés. Recientemente se han relacionado con procesos de estrés inflamatorio, especialmente durante una respuesta de fase aguda, aunque su función en estos procesos aún esta por definir.

PALABRAS CLAVE: Metalotioneínas (MTs), metales, homeostasis e inflamación.

ABSTRACT

Metallothioneins (MTs) are a family of low-molecular-weight proteins (6-7 kDa). These proteins can bind essential or no essential metals. The MT are characterized by high contents of sulfhidric groups of cysteine residues that constitute the 33% of the total molecule. *In vitro* studies show how these proteins are synthesized after a wide variety of chemical and physiological factors like cytokines, hormones, oxygen reactive species, metals and most importantly: stress. Recent studies suggest that Mts are involved in inflammatory response, specially during acute-phase response, even though its specific function in this process has not yet been described.

KEY WORDS: Metallothioneins (MTs), metals, homeostasis, inflammatory response.

¿QUÉ SON LAS METALOTIONEÍNAS?

Las metalotioneínas (MTs) están presentes en todos los organismos vivos; constituyen una superfamilia de proteínas intracelulares capaces de unir metales de transición y metales pesados. Las MTs fueron descubiertas por Margoshes y Valle en el año 1957, cuando las aislaron de la corteza renal de los equinos e identificaron como proteínas capaces de unir cadmio (Cd) (1). Son proteínas de bajo peso molecular, menores a 7 000 Da compuestas por 61 a 68 aminoácidos. Un rasgo destacable en la secuencia de aminoácidos de las MTs es la gran proporción de cisteínas (Cys) altamente conservadas, aproximadamente de 18 a 23; agrupadas en secuencias Cys-

X-Cys, Cys-Cys y Cys-X-Y-Cys, donde X y Y son aminoácidos diferentes de la cisteína. En 1993 Kägi encontró que también es considerable la conservación, aunque en menor medida, de las argininas (Arg) y lisinas (Lys) (Fig. 1) (2).

Se han descrito cuatro isoformas de las MTs (numeradas del I al IV). La MT-I y la MT-II se expresan 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. Aunque las MT-I y MT-II se encuentran en prácticamente todos los tejidos no se expresan en todas las células del tejido. Así por ejemplo, en el hígado se expresan en los hepatocitos

pero no en las células de Kupffer (3). La MT-III predominantemente se expresa en cerebro, principalmente en neuronas glutamatérgicas, también en menor cantidad en páncreas e intestino, tracto reproductor masculino y femenino, estómago, corazón y riñón. La expresión de MT-IV se encuentra en el epitelio escamoso estratificado y la lengua. La expresión de las diferentes isoformas de MT esta asociada al tipo celular y a un extenso rango de eventos fisiológicos y patológicos (4).

Las MTs están formadas por dos dominios globulares similares, denominados α y β en el extremo C-terminal y N-terminal, respectivamente. Cada dominio se encuentra unido entre sí por un *loop* o asa flexible (3).

*Recibido: 28 de marzo de 2007 Aceptado: 8 de mayo de 2007

Posgrado en Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Av. 14 Sur esq. Av. San Claudio s/n. Ciudad Universitaria. C.P. 72570, Puebla, Puebla, México. Correo E: atimurah@yahoo.es

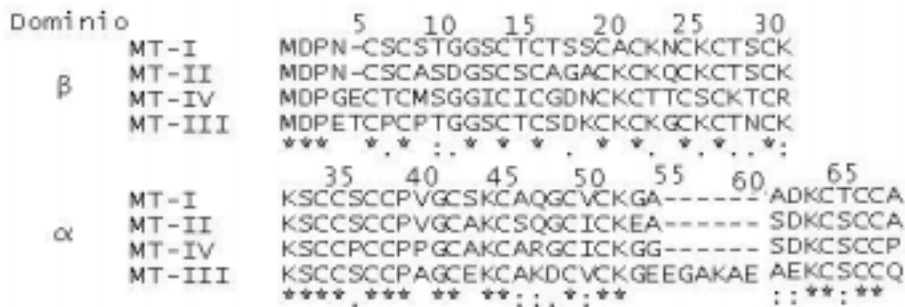


Figura 1. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las cuatro isoformas de metalotioneínas de ratón (*Mus musculus*), obtenido de Blast y ClustalW (5 y 6).

UNIÓN DE METALES A METALOTIONEÍNAS

El espectro de metales que pueden unirse a las MTs es bastante amplio. En condiciones fisiológicas las MTs suelen coordinar zinc (Zn) y/o cobre (Cu). No obstante si existen otros metales en el medio, como cadmio (Cd) o mercurio (Hg), estos pueden desplazar a los anteriores. Las MTs muestran diferentes afinidades dependiendo del metal, el Cu y el Hg figuran entre los metales con mayor afinidad por las MTs, mientras que el Zn es el menos afín. De manera resumida: $Zn^{2+} < Plomo (Pb^{2+}) < Cd^{2+} < Cu^{1+} < Plata (Ag^{1+}) < Hg^{2+} < Bismuto (Bi^{2+})$ (7). 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 tioneína. Normalmente las MT-I y MT-II aisladas de tejidos biológicos contienen 7 átomos de Zn por molécula, aunque también pueden poseer ciertas cantidades de Cu (3).

Las MTs presentan dos "clusters" o agrupamientos diferenciados en los cuales cada átomo metálico divalente está coordinado con cuatro cisteínas. El agrupamiento más cercano al extremo N-terminal es capaz de coordinar tres metales mientras que el más cercano al C-terminal une cuatro metales.

Las moléculas de MT-I y MT-II poseen cierta plasticidad estérica debido a la presencia del asa que une los dos dominios. Esta capacidad se consigue gracias a que no poseen un alto grado de estructuración debido a la carencia de estructuras secundarias rígidas. (8) 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 (8).

LOCALIZACIÓN DE LAS METALOTIONEÍNAS

En cuanto a la localización subcelular las MT-I y -II son proteínas esencialmente citoplasmáticas aunque también se ha detectado su presencia en fracciones mitocondriales y núcleos celulares (9).

FUNCIONES DE LAS METALOTIONEÍNAS

Las MTs están presentes en toda la escala evolutiva, se distribuyen prácticamente en todas las células del organismo y su expresión está activamente regulada por varios sistemas de control durante el desarrollo y la vida adulta. Estas características sugieren que las MTs pueden jugar un papel funcional importante, no solo para la célula u órgano sino en el organismo en cuestión, puesto que es extraordinario el grado de conservación de su estructura molecular; debió perdurar a pesar

de la adaptación química y metabólica propias de la presión evolutiva.

Sin embargo, a pesar de los numerosos esfuerzos realizados, las funciones que desempeñan las MTs no han sido dilucidadas en los 50 años transcurridos desde su descubrimiento. Se han propuesto numerosas funciones en las que podrían participar, sin embargo ninguna de ellas es plenamente satisfactoria. En 1985 Karin señaló que la función de estas proteínas estaba relacionada con la desintoxicación de metales pesados y xenobióticos, la regulación homeostática de metales esenciales y funciones antioxidantes celulares (10).

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 lo tanto, muchas de las funciones propuestas para las MTs giran en torno a su interacción con el Zn, Cu y otros metales que contaminan el ambiente. Las MTs podrían contribuir a mantener la concentración del Cu y el Zn dentro de un intervalo fisiológico. Se ha propuesto que juegan un papel en la absorción, el transporte y la excreción de metales esenciales (11).

De igual manera, también se ha propuesto que las MTs funcionan como proteínas desintoxicantes o protectoras frente al exceso de metales pesados en el ambiente, como podrían ser Zn, Cu, Cd, Hg, Pb, etc. Entre ellos figuran metales no fisiológicos, altamente tóxicos, como el Cd, el Pb y el Hg. 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 (12).

Otra de las funciones propuestas considera que las MTs son una reser-

va de Zn o Cu, constituyendo un "pool" dinámico de Zn que proporciona a diferentes constituyentes celulares bajo determinadas situaciones de estrés (2).

In vitro se ha observado que las MTs pueden intercambiar metales con varias apoproteínas. En algunos casos la liberación de Zn ocurre a mayor velocidad que la degradación de las MTs 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 las proteínas superóxido dismutasa y fosfatasa alcalina son capaces de sustraer metales de las MT-I y MT-II lo que ocasiona su activación (3). Por otro lado las metalotioneínas podrían secuestrar metales de otras proteínas como los factores de transcripción Sp1 y TFIIIA inhibiendo su unión al DNA (3).

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 su actividad (3). Por todos estos datos se ha propuesto que las MTs podrían formar un par regulador con la tioneína (T) de manera similar al glutatión con el glutatión reducido (3). Mediante la transferencia de metales el par MT/T podría intervenir en una multitud de procesos enzimáticos, transcripcionales o de apoptosis celular (3). 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 transducción de señales (3).

De esta manera durante situaciones de estrés 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.

Por otra parte, los animales "knock out" para las MT-I y II (MTKO) no presentan ninguna alteración en la síntesis de otras 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 cumplen un papel importante en situaciones en las que el Zn es limitante (3).

REGULACIÓN DEL GEN DE LAS METALOTIONEÍNAS

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 de desarrollo pre- y postnatal así como durante alteraciones de la homeostasis. Además, son proteínas altamente inducibles por gran variedad de condiciones fisiológicas y experimentales. No todos los tejidos responden igual ante un mismo estímulo, siendo quizá el hígado el órgano con mayor capacidad de respuesta desde el punto de vista de las MTs; por lo tanto, generalmente se ha usado este órgano en el estudio de la regulación de las MTs. (3).

INDUCTORES DE LA SÍNTESIS DE METALOTIONEÍNAS

Las MTs son capaces de sintetizarse ante una gran variedad de estímulos o inductores. Muchos de ellos son capaces de actuar tanto *in vivo* como *in vitro*. Teóricamente los inductores pueden actuar sobre varios niveles de regulación, siendo quizá el principal la tasa de transcripción, sin embargo en el gen de las MTs pueden confluir diferentes vías de transmisión de se-

ñales. A pesar de ser genes con diferentes elementos de respuesta y multirregulados, parece obvio que no puede haber un mecanismo individual para cada uno de los inductores (3).

La lista de inductores es extensa y de diversa naturaleza. Entre ellos encontramos los metales pesados, hormonas, factores de crecimiento, agentes inflamatorios, vitaminas, antibióticos, agentes citotóxicos y condiciones de estrés (Tabla 1). Además, existe una serie de situaciones que modulan la expresión de las MTs, como son el desarrollo, la regeneración tisular y la edad. También se ha descrito que la concentración de MTs aumenta durante procesos patológicos como el cáncer, enfermedades degenerativas o lesiones tisulares (3).

Entre otros agentes inductores encontramos agentes alquilantes, disolventes orgánicos, drogas anticancerígenas y herbicidas. Dada la diversidad y naturaleza xenobiótica de la mayoría de estos compuestos es difícil pensar que puedan existir mecanismos de respuesta específicos. Es muy probable que muchos de ellos induzcan la síntesis de MTs de una manera inespecífica a través de la producción de una respuesta secundaria en el organismo, como una respuesta al estrés, una inflamación o sobreproducción de radicales libres (3).

METALOTIONEÍNAS Y ESTRÉS

El estrés es un concepto amplio, pero desde un punto de vista genérico se puede decir que este término denota la respuesta del organismo, desarrollada durante la evolución, a cualquier perturbación de la homeostasis. Se trata 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

TABLA 1

Agentes inductores de MT-I y MT-II <i>in vitro</i> y/o <i>in vivo</i>	
Metales	Antibióticos
Cd, Zn, Cu, Hg, Au	Estreotocina
Ag, Co, Ni, Bi	Cicloheximida
	Acetaminofeno
Hormonas y factores de crecimiento	Agentes citotóxicos
Glucocorticoides	Hidrocarburos
Progesterona	Etanol
Estrógenos	Isopropanol
Catecolaminas	Cloroformo
Glucagón	Tetracloruro de carbono
Insulina	EDTA
Angiotensina II	
IGF-1	
EGF	
Agentes inflamatorios y citoquinas	Condiciones estresantes
LPS	Privación de movimiento
Dexametazona	Inflamación
Turpentina	Irradiación
IL-1	Inmovilización
IL-6	
IFN- α y $-\gamma$	
TNF- α	

Adaptado de la referencia 2.

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.) (3).

Se ha observado que estos tres tipos de estímulos estresantes son capaces de inducir MT-I y MT-II, sugiriendo que estas proteínas forman parte de la respuesta al estrés. Estudios en cultivo de células humanas y de roedores han mostrado 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 (3).

METALOTIONEÍNAS E INFLAMACIÓN

Se ha analizado la síntesis de MTs en el hígado durante el proceso de inflamación aguda en ausencia de infección; un agente experimental empleado con frecuencia es el lipopolisacárido

bacteriano (LPS), también denominada endotoxina. Es una molécula derivada de la pared bacteriana de los microorganismos 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 un incremento de la síntesis de citoquinas proinflamatorias en diversos órganos, proceso parecido al que se produce tras inflamación, infección o traumatismo. (3).

Se podría definir a la respuesta de fase aguda como la reacción del organismo frente a una variación de la homeostasis debida a infección, daño tisular, crecimiento neoplásico, desórdenes inmunológicos o estrés; su objetivo es restaurar la homeostasis. Por lo tanto, 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.

La fase se caracteriza por un incremento de la temperatura corporal, leucocitosis, activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), descenso de la concentración de suero y variaciones en la concentración de determinadas proteínas sintetizadas en el hígado como es el caso de los aumentos en las concentraciones de MT-I y MT-II, por todo esto se les ha considerado como proteínas de fase aguda (3).

MODELOS DE ESTUDIO DE METALOTIONEÍNAS E INFLAMACIÓN

Se ha estudiado otro modelo de inflamación en ausencia de infección: la cirugía. Ésta consiste en realizar una incisión abdominal observar los órganos sin extirpación de alguno y se sutura pasando aproximadamente un minuto después de la incisión. En este modelo se ha observado en las primeras 24 h la inducción en la síntesis de MTs hepáticas inducida posiblemente por la liberación de mediadores inflamatorios, como hormonas y citoquinas. Mostrando un incremento significativo durante las primeras 12 horas posteriores a la cirugía (13).

Hernández y col. en el 2000 mostraron en ratón que después de un estrés por inmovilización se incrementaban los niveles de mRNA MT-I y MT-I y MT-II. También se observó una dis-

minución de esta respuesta al administrar RU-486 que es un bloqueador del receptor de glucocorticoides; además al realizar una extirpación quirúrgica de las glándulas adrenales (adrenalectomía; ADX) tiende a disminuir los niveles de MT I y II bajo el mismo estímulo estresante (14).

Las hormonas glucocorticoides (GC's) inducen la síntesis de MT (4). Los receptores de hormonas glucocorticoides (GRs) se encuentran normalmente en el citoplasma de las células y están unidos a proteínas de choque térmico (Hsps) las cuales mantienen a los GRs en una conformación inactiva.

Las hormonas glucocorticoides entran a la célula y se unen al monómero GR inactivo induciendo la disociación de las Hsps y la activación de GR. Los monómeros GR activados ahora se combinan para formar homodímeros de GR, los cuales se traslocan al núcleo unidos a elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) en la región reguladora del gen MT y activan la transcripción de los genes de MT-I y MT-II (15). Los GREs son elementos "enhancer" o mejoradores del GC dependiente presentes como una copia simple dentro de los primeros cientos de pares de bases (pb) río arriba del lugar de inicio de la transcripción en el gen humano MT-II y como dos copias en el gen de ratón MT-II y MT-I. Las copias tándem están separada por aproximadamente 150 pb y son 1kb río arriba del sitio de inicio de transcripción del gen de ratón MT-II, y 7kb río arriba del gen de ratón MT-I (4).

Cada GRE media independientemente o sea, solo y sin un segundo GRE la respuesta transcripcional a los glucocorticoides endógenos como por ejemplo la hidrocortisona y a la dexametasona que es un glucocorticoide agonista sintético, por medio de interacción del GC con un GR citoplásmico (15). El tratamiento de

células con RU-486 (Mifepristone), un antagonista del receptor GC, suprime la expresión de MT que inducen las GCs. En ratones la inducción de MT-I y -II mediante los GCs es aproximadamente igual que en humanos, la MT-II es más fuertemente inducida que la MT-I (15).

A pesar de la presencia de un GRE capaz de unir al GR en la región reguladora de los genes de mamíferos MT-I, los genes MT-I no responden a los GCs cuando se prueban en expresiones recombinantes en sistemas de vectores. Por lo tanto, los GRE localizados río arriba del gen de humanos y roedores de MT-II río arriba de MT-I, median la respuesta de MT-I y MT-II por los GCs (4, 15).

En respuesta a la inflamación o infección se activan las células T y macrófagos, los cuales liberan interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). El estrés incrementa las citocinas las cuales estimulan el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal y se unen al complejo citoplásmico receptor de glucocorticoides (GRF) a activa a los elementos de GREs en el gen-MT (15).

Cuando los glucocorticoides inducen la síntesis de MT inicia el secuestro de Zn desde el plasma y originan una poza intracelular de Zn, el cual activará los elementos de respuesta a metales (MREs) mediante el factor de transcripción de metales-1 (MTF-1), produciendo una regulación positiva. La inducción de IL-6 posiblemente sea por la IL-1 y el TNF- α en una variedad de tejidos y por las catecolaminas (15). La IL-6 regula la expresión de MT y varias proteínas de respuesta de fase aguda por medio de inducir la fosforilación de tirosina de los transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT) de proteínas, que interactúa con los sitios de la región promotora del gen-MT (15). La síntesis de STAT3 es estimulada como respuesta a IL-6, oncostatina M, factor inhibidor de leucemia, la IL-11, el factor de crecimiento epidermal (EGF), y factor de estimulación de colonia de granulocitos (G-CSF) (15).

Los glucocorticoides juegan un papel muy importante en la inducción de la MT-hepática mediada por IL-6 y la sinergia entre los dos glucocorticoides

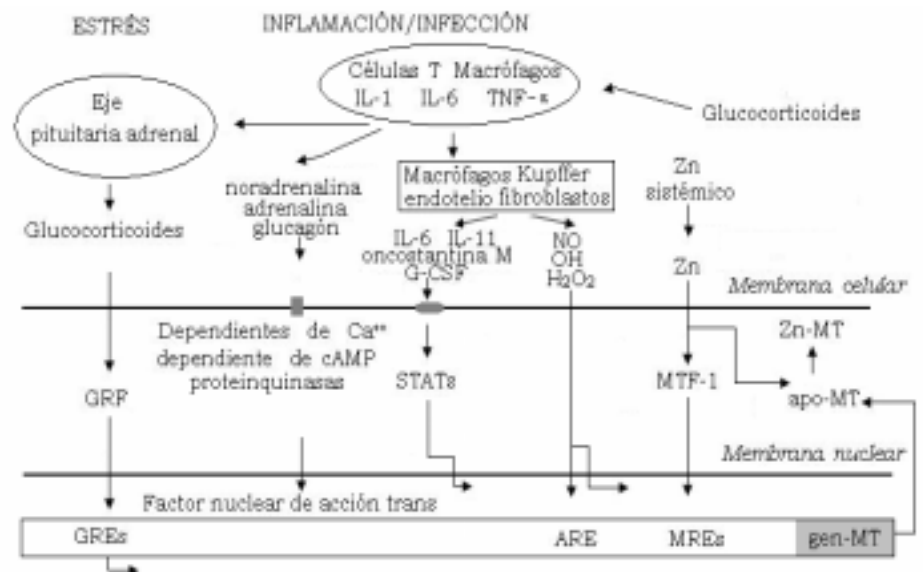


Figura 2. Esquema de la regulación del gen-MT hepática en respuesta a la inflamación e infección Adaptado de la referencia 15.

e IL-6, parece requerir la interacción física de los elementos de respuesta de cada uno. Las citocinas también causan expresiones variables de isoformas de MT en diferentes tejidos, la IL-6 y TNF- α inducen más MT-II que MT-I en el hígado mientras que el TNF- α es un inductor más fuerte que la IL-6 de la MT-I en pulmón y corazón (15). Las catecolaminas y el glucagón inducidos por mediadores inflamatorios se unen a los receptores de membrana y vía segundos mensajeros activan los factores nucleares de transcripción que interactúan con elementos de control todavía no

identificados. Especies reactivas de oxígeno formadas durante la respuesta inflamatoria pueden interactuar con los elementos de respuesta antioxidantes (ARE) y/o varios MRES (15) (Fig. 2).

Todas estas hormonas han sido propuestas como inductoras de la síntesis de las diferentes isoformas de las metalotioneínas, de manera diferente en cada una de ellas, actuando directa o indirectamente sobre el promotor del gen-MT.

Las MTs son biomoléculas que pueden funcionar como un sistema de desintoxicación de metales pesados,

captura y neutralización de radicales libres, así como un sistema de regulación homeostática para el ión Zn y como un mecanismo de reparación tisular. Por lo que queda pendiente muchos trabajos experimentales para abundar más en el conocimiento de esta proteína como respuesta a procesos inflamatorios, estrés, metales pesados y efectos neuroprotectores; sobre todo en la producción de ratones genéticamente modificados como una herramienta poderosa que ayude de forma importante en el conocimiento de los posibles papeles de estas proteínas.

REFERENCIAS

- Margoshes M, Valle BL (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79:4813-4814.
- Kägi JHR (1993) Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. In *Metallothionein III*. Suzuki KT, Imura N and Kimura M, Eds, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. 29-55.
- Carrasco TJ (2000) Regulación de las metalotioneínas durante el estrés y la inflamación, y su influencia durante la respuesta inflamatoria. Memoria de Tesis, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Hag F, Mahoney M, Koroptnick J (2003) Signalling events for metallothionein induction. *Review. Mutation Research* 533: 211-226.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?> (Fecha de consulta: 19/03/2007).
- <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> (Fecha de consulta: 19/03/2007).
- Kägi JH, Kojima Y (1987) Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia* 52:25-61.
- Messerle BA., Schäffer A, Vasák M (1992) Comparison of the solution conformation of human (Zn7)-metallothionein-2 and (Cd7) using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Mol Biol* 225: 433-443.
- Banerjee D, Onosaka S, Cheroam MG (1982) Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of rat liver and kidney. *Toxicology* 24:95-105.
- Karin M (1985) Metallothioneins: Proteins in search of function. *Cell* 41: 9-10.
- Cousins RJ (1985) Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev* 65: 238-309.
- Huang PC (1993) Metallothionein structure/function interface. In *Metallothionein III*, Suzuki KT, Imura N and Kimura M, Eds. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. 407-426.
- Brambila E, Muñoz SJL, Albores A, Waalkes M (1999) Early effects of surgery on zinc and metallothionein levels in female rats. *Biological Trace Element Research* 70: 173-182.
- Hernández J, Carrasco J, Belloso E, Giratt M, Bluethmann H, Lee KD, Andrews GK, Hidalgo J (2000) Metallothionein induction by restraint stress: Role of glucocorticoids and IL-6. *Citokine* 12(6): 791-796.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: The multipurpose protein. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 59:627-647.