

Respuesta del sistema nervioso central a lesiones traumáticas: papel de las proteínas antioxidantes metalotioneínas

© Juan Hidalgo, 2004
e-mail: Juan.Hidalgo@uab.es

RESUMEN

Lesiones mecánicas del sistema nervioso central (SNC) de un mamífero adulto pueden causar pérdidas funcionales generalizadas que en muchos casos resultan en déficits neurológicos permanentes. La severidad clínica observada es consecuencia de la poca capacidad que tiene el SNC para reconstruirse después de una lesión traumática, en contraposición con la mayoría de tejidos periféricos. Esto es particularmente evidente en lo que a la proliferación neuronal y al restablecimiento de conexiones neuronales se refiere. Sin embargo, en realidad el SNC responde robustamente a una gran variedad de lesiones traumáticas. Las neuronas, las principales células del SNC, pero también las células gliales (fundamentalmente microglia y astrocitos), generan multitud de factores (neurotrofinas, factores de crecimiento, citoquinas, etc.) que forman una compleja red reguladora de la supervivencia neuronal, activación glial y reclutamiento de células inflamatorias, y que intentan frenar las consecuencias de la lesión. Dilucidar las causas por las que, a pesar de estas respuestas, el SNC no consigue restablecer su estructura tras una lesión es de importancia fundamental. Diversas evidencias indican que el estrés oxidativo, un desequilibrio entre la producción de radicales libres del oxígeno y los sistemas antioxidantes de la célula, podría tener una especial relevancia en la patofisiología de las lesiones traumáticas del SNC, y probablemente en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Mi grupo de investigación ha trabajado, entre otros aspectos de la respuesta inflamatoria, en la caracterización del papel de las proteínas antioxidantes metalotioneínas (MT) en la respuesta del SNC frente a diversos modelos de daño cerebral en el ratón.

ABSTRACT

Traumatic injury of the Central Nervous System (CNS) of an adult mammal may cause generalized functional losses that often result in permanent neurologic deficits. The clinical severity observed is caused by the poor capacity of the CNS for repairing itself following a traumatic lesion, in contrast to peripheral tissues. This is particularly evident regarding neuronal proliferation and restoration of the circuitry. However, actually the CNS responds prominently to a large variety of traumatic lesions. Neurons, the main cells of the CNS, but also glial cells (mainly microglia and astrocytes), produce many factors (neurotrophins, growth factors, cytokines, etc.) that form a complex regulatory net of neuronal survival, glial activation and recruitment of inflammatory cells, and that attempt to reduce the consequences of the lesion. To determine the causes of the poor capacity of the CNS for repair despite these robust responses is of great importance. Several evidences show that oxidative stress, an imbalance between the production of free radicals and the antioxidant mechanisms of the cell, could have a special relevance in the pathophysiology of the traumatic CNS injuries, and likely of neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease. My group of research has investigated, among other aspects of the inflammatory response, of the role of the antioxidant proteins metallothioneins (MT) in the response of the CNS to a number of injury models in mice.

Metalotioneínas: una superfamilia de proteínas

En 1957, Margoshes y Vallee describían por primera vez una proteína del riñón de caballo que mostraba una alta afinidad por el cadmio, un metal pesado tóxico (Margoshes & Vallee, 1957). Esta proteína fue subsecuentemente caracterizada bioquímicamente por Kägi y Vallee (Kägi & Vallee, 1960; Kägi & Valle, 1961), y en base a su alto contenido metálico y de residuos del aminoácido cisteína (Cys), nombrada metalotioneína (MT). En estas históricas publicaciones se sugirieron funciones fisiológicas tales como el transporte y almacenamiento de metales pesados esenciales (zinc, cobre) y la detoxificación de metales no esenciales (cadmio, mercurio), pero actualmente se considera que otras funciones, como la protección frente al estrés oxidativo, son más probables. Desde el descubrimiento en 1991 de la MT-III como un posible factor inhibidor de la supervivencia neuronal implicado en la etiología de la enfermedad de Alzheimer (Uchida *et al.*, 1991), el interés por estas proteínas ha crecido de manera extraordinaria. En esta revisión comentaré diversos aspectos de estas proteínas en cuanto a su

papel en el sistema nervioso central (SNC). Para una discusión más general de estas proteínas, consúltese libros y revisiones como los siguientes (Kägi & Nordberg, 1979; Cousins, 1985; Hamer, 1986; Kägi & Kojima, 1987; Klaassen, 1999).

En base a sus aspectos estructurales, las MTs se han dividido en diversas familias (Binz & Kägi, 1999). Las MTs de mamífero pertenecen a la familia 1, que comprende varias subfamilias, m1-m4. En el ratón las subfamilias m1-4 están compuestas por un solo miembro (MT-I en la subfamilia m1, MT-II en la m2, etc.), mientras que en ungulados y primates existe un claro polimorfismo genético. En humanos los genes *MT* están localizados en el cromosoma 16, y conforman una familia de al menos 12 genes, algunos de los cuales no son funcionales (Hamer, 1986; West *et al.*, 1990; Samson & Gedamu, 1998). En posición 5' se encuentra el gen *MT-4*, que se expresa fundamentalmente en el epitelio estratificado queratinizado (Quaife *et al.*, 1994), a continuación el gen *MT-3*, que se expresa principalmente en el SNC, y luego el gen *MT-2* y cinco genes funcionales *MT-1* designados *MT-1A-MT-1G* que se expresan de forma general (Samson & Gedamu, 1998). En el ratón los genes *MT* residen en el cromosoma 8 (Palmiter *et al.*, 1992; Palmiter *et al.*, 1993b; Quaife *et al.*, 1994) y siguen un patrón de expresión similar a los humanos (Searle *et al.*, 1984; Yagle & Palmiter, 1985; Palmiter *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1993; Quaife *et al.*, 1994).

Presumiblemente las funciones biológicas de las MT pueden correlacionarse con sus propiedades químicas y estructurales. Las tres isoformas que se expresan en el SNC, MT-I, MT-II y MT-III, están compuestas de una única cadena polipeptídica de 61-68 amino ácidos, 20 de los cuales son residuos Cys, y, notablemente, carecen de aminoácidos aromáticos o de Histidina (His). Sus secuencias se caracterizan por la presencia de varias repeticiones Cys-X-Cys y Cys-Cys y por la alta conservación de las Cys entre las diferentes MTs (Kägi & Schäffer, 1988). Estas proteínas pueden unir 7 metales divalentes (Zn(II), Cd(II)) y hasta 12 monovalentes (Cu(I)) mediante enlaces con los grupos tiol de las Cys (Vasák & Kägi, 1994). Los metales se distribuyen en dos grupos que contienen 3 y 4 metales divalentes o 6 metales monovalentes cada uno, localizados en dominios independientes de la proteína designados α (residuos 32-61) y β (residuos 1-31) (Vasák & Kägi, 1994). La secuencia de la MT-III, en comparación a las de las MT-I&II, muestra dos insertos, un residuo Treonina (Thr) en la región N-terminal y un hexapéptido en la región C-terminal, y una secuencia Cys(6)-Pro-Cys-Pro(9) que le es propia (Uchida *et al.*, 1991).

Metalotioneínas en el Sistema Nervioso Central: Factores neuroprotectores

El consenso general es que las MT-I&II se expresan por todo el SNC, siendo los astrocitos la principal fuente de estas proteínas (Young *et al.*, 1991; Blaauwgeers *et al.*, 1993; Young, 1994; Nakajima & Suzuki, 1995; Penkowa & Moos, 1995; Vela *et al.*, 1997; Acarin *et al.*, 1999b; Carrasco *et al.*, 1999). Las neuronas expresan estas proteínas en menor medida (Blaauwgeers *et al.*, 1993; Masters *et al.*, 1994; Kiningham *et al.*, 1995; van Lookeren Campagne *et al.*, 1999), mientras que en condiciones normales la microglía y los oligodendrocitos no parecen expresarlas. Sin embargo, células microgliales activadas por diversos tipos de estímulos muestran una clara expresión de MT-I&II (Vela *et al.*, 1997; Acarin *et al.*, 1999b; Carrasco *et al.*, 1999; Penkowa *et al.*, 1999a; Penkowa *et al.*, 1999c; Carrasco *et al.*, 2000b).

A diferencia de las MT-I&II, la MT-III es una isoforma que se expresa fundamentalmente en el SNC, y fue denominada originalmente “Growth Inhibitory Factor (GIF)” (Uchida *et al.*, 1991), si bien actualmente no hay dudas de que es un miembro de la familia de las MT (Palmiter *et al.*, 1992). Respecto a su localización celular, al día de hoy existen fuertes discrepancias en la literatura en función del sistema de detección usado. Cuando se identifica la proteína, la expresión de la MT-III está localizada fundamentalmente en astrocitos (Uchida *et al.*, 1991; Hozumi *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1996; Acarin *et al.*, 1999a; Carrasco *et al.*, 1999; Penkowa *et al.*, 1999c; Carrasco *et al.*, 2000a; Penkowa *et al.*, 2001), mientras que si analizamos su RNA mensajero la localización es básicamente neuronal (Masters *et al.*, 1994b; Anezaki *et al.*, 1995; Yuguchi *et al.*, 1995a; Carrasco *et al.*, 1998a; Acarin *et al.*, 1999a; Penkowa *et al.*, 1999b; Velázquez *et al.*, 1999), aunque las discrepancias entre autores son obvias (Kobayashi *et al.*, 1993; Uchida, 1993; Yanagitani *et al.*, 1999).

Las lesiones traumáticas del SNC inician una compleja secuencia de respuestas patofisiológicas en el lugar de la lesión. En fases tempranas la destrucción de los vasos sanguíneos causa una extravasación de sangre en la zona lesionada, llenándola de células que inician una respuesta inflamatoria característica. La pérdida de riego sanguíneo causa isquemia e hipoxia local, lo que junto a una gran liberación de aminoácidos excitatorios provoca la necrosis de neuronas y células gliales locales y la degeneración de fibras nerviosas que atraviesan la zona dañada. Posteriormente a estas respuestas tempranas, la microglía residente y los monocitos/macrófagos infiltrantes se

activan y transforman en macrófagos cerebrales ameboides, los linfocitos infiltran masivamente el área dañada, y células endoteliales locales migran y proliferan. Los astrocitos se activan también en respuesta al daño del SNC. El reclutamiento y activación de todas estas células limita la degeneración neuronal y la extensión de la lesión, resultando finalmente en una cicatriz glial rodeando la zona lesionada. Generalmente se acepta que esta respuesta inflamatoria está orquestada por la secreción de citoquinas, quimioquinas y otros factores por parte, fundamentalmente, de los astrocitos, macrófagos cerebrales y otras células inflamatorias, que estimulan a neuronas y células gliales para que produzcan sus propias citoquinas, factores de crecimiento y neurotrofinas (para revisiones consúltase Giulian *et al.*, 1989; Eddleston & Mucke, 1993; Mattson & Scheff, 1994; Hopkins & Rothwell, 1995; Perry *et al.*, 1995; Rothwell & Hopkins, 1995; Merrill & Benveniste, 1996; Ridet *et al.*, 1997; McIntosh *et al.*, 1998; Muñoz-Fernández & Fresno, 1998; Stichel & Verner Müller, 1998; Hughes *et al.*, 1999; Horner & Gage, 2000; Allan & Rothwell, 2001; Aloisi, 2001; Dong & Benveniste, 2001).

La evidencia experimental que apoya un papel significativo del estrés oxidativo en el cerebro tras una lesión traumática es abrumadora. El cerebro es especialmente susceptible a sufrir daño por la generación de radicales del oxígeno porque sus membranas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, produce cantidades importantes de óxido nítrico, tiene una pobre actividad catalasa y sólo moderada superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (enzimas antioxidantes que forman una potente línea de defensa contra el estrés oxidativo), y es rico en hierro, el cual puede ser liberado desde las células moribundas y generar el altamente reactivo radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton. Una lesión del SNC causa una entrada y activación de células inflamatorias, las cuales típicamente incrementan la formación de radicales libres como mecanismo de neutralización de patógenos que eventualmente penetran en la zona lesionada, pero también como consecuencia de su actividad fagocítica de los restos tisulares. En esta situación, y más aún cuando la perfusión sanguínea del tejido se reestablece, se da un desequilibrio entre los sistemas antioxidantes y la formación de radicales libres, y, por tanto, estrés oxidativo. Evolutivamente los organismos han desarrollado mecanismos de protección contra el estrés oxidativo que incluyen los enzimas antioxidantes descritos antes, secuestrantes de radicales libres como el glutatión, vitamina E y los β -carotenos, así como proteínas que unen metales de transición como el hierro y el cobre (para revisiones consúltase (Halliwell, 1992; Coyle & Puttfarcken, 1993; Olanow, 1993; Mattson & Scheff, 1994; Merrill & Benveniste, 1996; Heales *et al.*, 1999;

Lipton, 1999; Pentreath & Slamon, 2000)).

Mi laboratorio junto con otros ha demostrado que la familia de las MT son factores neuroprotectores significativos frente al daño oxidativo. *Mt1&2* se expresan de forma coordinada en la mayoría de tejidos incluido el SNC, y se inducen por estímulos inflamatorios, estrés y metales pesados (Yagle & Palmiter, 1985; van Lookeren Campagne *et al.*, 2000). En humanos sabemos que las MT-I&II están inducidas en enfermedades neurodegenerativas tan importantes como la enfermedad de Alzheimer (Duguid *et al.*, 1989; Adlard *et al.*, 1998), la esclerosis lateral amiotrófica (Sillevis Smitt *et al.*, 1992) y la esclerosis múltiple (Lock *et al.*, 2002). En modelos animales sabemos que las MT-I&II se inducen por daño cerebral inducido por estrés (Hidalgo *et al.*, 1990), criolesión (Penkowa & Moos, 1995; Penkowa *et al.*, 1999a), convulsiones epilépticas (Dalton *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1995; Montpied *et al.*, 1998; Carrasco *et al.*, 2000b), NMDA (Acarin *et al.*, 1999b), 6-aminonicotinamida (Penkowa *et al.*, 1997; Penkowa *et al.*, 1999b), isquemia (Neal *et al.*, 1996; van Lookeren Campagne *et al.*, 1999; van Lookeren Campagne *et al.*, 2000) y expresión transgénica de citoquinas proinflamatorias (Hernández *et al.*, 1997; Carrasco *et al.*, 2000a; Giralt *et al.*, 2001). La producción de ratones genéticamente alterados (Michalska & Choo, 1993; Palmiter *et al.*, 1993a; Masters *et al.*, 1994a) es una herramienta poderosa que ha ayudado de forma importante en el conocimiento de los posibles roles de estas proteínas. Así, la sobreexpresión de MT-I protege contra la isquemia cerebral focal (van Lookeren Campagne *et al.*, 1999), mientras que ratones con ausencia de MT-I&II (comúnmente conocidos como ratones MT-I&II KO, “knock-out”) son más susceptibles (Trendelenburg *et al.*, 2002). Igualmente, los ratones MT-I&II KO muestran una respuesta muy deficiente a lesiones traumáticas del SNC, con una respuesta inflamatoria alterada, un estrés oxidativo y muerte celular por apoptosis (un mecanismo celular intrínseco que permite a la célula suicidarse sin afectar a sus vecinas) incrementados, y una reparación tisular disminuida (Penkowa *et al.*, 1999a; Penkowa *et al.*, 2000; Penkowa *et al.*, 2001). Estos efectos se revierten en ratones con sobreexpresión de MT-I e, interesantemente, por la inyección de MT-II (Giralt *et al.*, 2002b). Lo último abre perspectivas terapéuticas prometedoras que, además, se ven reforzadas por el hecho de que tratamientos similares han demostrado su eficacia en modelos experimentales de esclerosis múltiple (Penkowa & Hidalgo, 2000; 2001; 2003). El efecto neuroprotector de estas proteínas es también obvio en modelos de daño del SNC inducido por citoquinas (Giralt *et al.*, 2002a; Molinero *et al.*, 2003) o por gliotoxinas (Penkowa *et al.*, 2002). Estos y otros resultados apoyan la idea de que las MT-

I&II son potentes factores antioxidantes, particularmente efectivos en el SNC.

La función de la MT-III, que se expresa preferentemente en neuronas, es menos clara. Su expresión se ve afectada en respuesta al daño del SNC, incluyendo lesiones traumáticas, excitotoxicidad, secciones de nervios, o isquemia (Anezaki *et al.*, 1995; Hozumi *et al.*, 1995; Yuguchi *et al.*, 1995a; Yuguchi *et al.*, 1995b; Hozumi *et al.*, 1996; Inuzuka *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1996; Acarin *et al.*, 1999a; Penkowa *et al.*, 2000), pero su relevancia fisiológica no está clara ya que los ratones MT-III KO no difieren significativamente de los controles en sus respuestas a lesiones traumáticas (Carrasco *et al.*, 2003).

Bibliografía

- Acarin, L., Carrasco, J., González, B., Hidalgo, J. & Castellano, B. (1999a) Expression of growth inhibitory factor (metallothionein-III) mRNA and protein following excitotoxic immature brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, **58**, 389-397.
- Acarin, L., González, B., Hidalgo, J., Castro, A.J. & Castellano, B. (1999b) Primary cortical glial reaction versus secondary thalamic glial response in the excitotoxically injured young brain: astroglial response and metallothionein expression. *Neuroscience*, **92**, 827-839.
- Adlard, P.A., West, A.K. & Vickers, J.C. (1998) Increased density of metallothionein I/II-immunopositive cortical glial cells in the early stages of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.*, **5**, 349-356.
- Allan, S.M. & Rothwell, N.J. (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature Rev Neurosci*, **2**, 734-744.
- Aloisi, F. (2001) Immune function of microglia. *Glia*, **36**, 165-179.
- Anezaki, T., Ishiguro, H., Hozumi, I., Inuzuka, T., Hiraiwa, M., Kobayashi, H., Yuguchi, T., Wanaka, A., Uda, Y., Miyatake, T., Yamada, K., Tohyama, M. & Tsuji, S. (1995) Expression of growth inhibitory factor (GIF) in normal and injured rat brains. *Neurochem. Int.*, **27**, 89-94.
- Binz, P.-A. & Kägi, J.H.R. (1999) Metallothionein: Molecular evolution and classification. In Klaassen, C.D. (ed.) *Metallothionein IV*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 7-13.
- Carrasco, J., Giralt, M., Molinero, A., Penkowa, M., Moos, T. & Hidalgo, J. (1999) 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. *J Neurotrauma*, **16**, 1115-1129.
- Carrasco, J., Giralt, M., Penkowa, M., Stalder, A.K., Campbell, I.L. & Hidalgo, J. (2000a) Metallothioneins are upregulated in symptomatic mice with astrocyte-targeted expression of tumor necrosis factor- α . *Exp. Neurol.*, **163**, 46-54.
- Carrasco, J., Penkowa, M., Giralt, M., Camats, J., Molinero, A., Campbell, I.L., Palmiter, R.D. & Hidalgo, J. (2003) Role of metallothionein-III following central nervous system damage. *Neurobiol. Dis.*
- Carrasco, J., Penkowa, M., Hadberg, H., Molinero, A. & Hidalgo, J. (2000b) Enhanced seizures and hippocampal neurodegeneration following kainic acid induced seizures in metallothionein-I+II deficient mice. *Eur J Neurosci*, **12**, 2311-2322.

- Coyle, J. & Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, **262**, 689-695.
- Dalton, T., Pazdernik, T.L., Wagner, J., Samson, F. & Andrews, G.K. (1995) Temporalspatial patterns of expression of metallothionein-I and -III and other stress related genes in rat brain after kainic acid-induced seizures. *Neurochem Int*, **27**, 59-71.
- Dong, Y. & Benveniste, E.N. (2001) Immune function of astrocytes. *Glia*, **36**, 180-190.
- Duguid, J.R., Bohmont, C.W., Liu, N.G. & Tourtellotte, W.W. (1989) Changes in brain gene expression shared by scrapie and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7260-7264.
- Eddleston, M. & Mucke, L. (1993) Molecular profile of reactive astrocytes-Implications for their role in neurological disease. *Neuroscience*, **1**, 15-36.
- Giralt, M., Carrasco, J., Penkowa, M., Morcillo, M.A., Santamaria, J., Campbell, I.L. & Hidalgo, J. (2001) Astrocyte-targeted expression of interleukin-3 and interferon- α causes specific changes in metallothionein expression in the brain. *Exp. Neurol.*, **168**, 334-346.
- Giralt, M., Penkowa, M., Hernández, J., Molinero, A., Carrasco, J., Lago, N., Camats, J., Campbell, I.L. & Hidalgo, J. (2002a) Metallothionein-1+2 deficiency increases brain pathology in transgenic mice with astrocyte-targeted expression of interleukin 6. *Neurobiol Dis*, **9**, 319-338.
- Giralt, M., Penkowa, M., Lago, N., Molinero, A. & Hidalgo, J. (2002b) Metallothionein-1+2 protect the CNS after a focal brain injury. *Exp Neurol*, **173**, 114-128.
- Giulian, D., Chen, J., Ingemann, J., George, J. & Noponen, M. (1989) The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. *J Neurosci*, **12**, 4416-4429.
- Halliwell, B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*, **59**, 1609-1623.
- Hamer, D.H. (1986) Metallothionein. *Annu Rev Biochem*, **55**, 913-951.
- Heales, S.J., Bolanos, J.P., Stewart, V.C., Brookes, P.S., Land, J.M. & Clark, J.B. (1999) Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta*, **1410**, 215-228.
- Hernández, J., Molinero, A., Campbell, I.L. & Hidalgo, J. (1997) Transgenic expression of interleukin 6 in the central nervous system regulates brain metallothionein-I and -III expression in mice. *Brain Res Mol Brain Res*, **48**, 125-131.
- Hidalgo, J., Borrás, M., Garvey, J.S. & Armario, A. (1990) Liver, brain, and heart metallothionein induction by stress. *J Neurochem*, **55**, 651-654.
- Hopkins, S. & Rothwell, N. (1995) Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci*, **18**, 83-88.
- Horner, P.J. & Gage, F.H. (2000) Regenerating the damaged central nervous system. *Nature*, **407**, 963-970.
- Hozumi, I., Inuzuka, T., Hiraiwa, M., Uchida, Y., Anezaki, T., Ishiguro, H., Kobayashi, H., Uda, Y., Miyatake, T. & Tsuji, S. (1995) Changes of growth inhibitory factor after stab wounds in rat brain. *Brain Res*, **688**, 143-148.
- Hozumi, I., Inuzuka, T., Ishiguro, H., Hiraiwa, M., Uchida, Y. & Tsuji, S. (1996) Immunoreactivity of growth inhibitory factor in normal rat brain and after stab wounds--an immunocytochemical study using confocal laser scan microscope. *Brain Res*, **741**, 197-204.
- Hughes, P.E., Alexi, T., Walton, M., Williams, C.E., Dragunow, M., Clark, R.G. & Gluckman, P.D. (1999) Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog Neurobiol*, **57**, 421-450.

- Inuzuka, T., Hozumi, I., Tamura, A., Hiraiwa, M. & Tsuji, S. (1996) Patterns of growth inhibitory factor (GIF) and glial fibrillary acidic protein relative level changes differ following left middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*, **709**, 151-153.
- Kägi, J.H. & Schäffer, A. (1988) Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, **27**, 8509-8515.
- Kägi, J.H.R. & Valle, B.L. (1961) Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. II. Physicochemical properties. *J Biol Chem*, **236**, 2435-2442.
- Kägi, J.H.R. & Vallee, B.L. (1960) Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem*, **235**, 3460-3465.
- Kobayashi, H., Uchida, Y., Ihara, Y., Nakajima, K., Kohsaka, S., Miyatake, T. & Tsuji, S. (1993) Molecular cloning of rat growth inhibitory factor cDNA and the expression in the central nervous system. *Mol Brain Res*, **19**, 188-194.
- Lipton, P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.*, **79**, 1431-1568.
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., Klonowski, P., Austin, A., Lad, N., Kaminski, N., Galli, S.J., Oksenberg, J.R., Raine, C.S., Heller, R. & Steinman, L. (2002) Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.*, **8**, 500-508.
- Margoshes, M. & Vallee, B.L. (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 4813-4814.
- Masters, B.A., Kelly, E.J., Quaife, C.J., Brinster, R.L. & Palmiter, R.D. (1994a) Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 584-588.
- Masters, B.A., Quaife, C.J., Erickson, J.C., Kelly, E.J., Froelick, G.J., Zambrowicz, B.P., Brinster, R.L. & Palmiter, R.D. (1994b) Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci*, **14**, 5844-5857.
- Mattson, M. & Scheff, S. (1994) Endogenous neuroprotection factors and traumatic brain injury: mechanisms of action and implications for therapy. *J Neurotrauma*, **11**, 3-33.
- McIntosh, T., Juhler, M. & Wieloch, T. (1998) Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, **15**, 731-769.
- Merrill, J.E. & Benveniste, E.N. (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci*, **19**, 331-338.
- Michalska, A.E. & Choo, K.H. (1993) Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8088-8092.
- Molinero, A., Penkowa, M., Hernández, J., Camats, J., Giral, M., Lago, N., Carrasco, J., Campbell, I.L. & Hidalgo, J. (2003) Metallothionein-I overexpression decreases brain pathology in transgenic mice with astrocyte-targeted expression of interleukin 6. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **en prensa**.
- Montpied, P., de Bock, F., Baldy Moulinier, M. & Rondouin, G. (1998) Alterations of metallothionein II and apolipoprotein J mRNA levels in kainate-treated rats. *Neuroreport*, **9**, 79-83.
- Muñoz-Fernández, M.A. & Fresno, M. (1998) The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog. Neurobiol.*, **56**, 307-340.
- Neal, J.W., Singhrao, S.K., Jasani, B. & Newman, G.R. (1996) Immunocytochemically detectable metallothionein is expressed by astrocytes in the ischaemic human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **22**, 243-247.
- Olanow, C. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci*, **16**, 439-444.

- Palmiter, R.D., Findley, S.D., Whitmore, T.E. & Durnam, D.M. (1992) MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6333-6337.
- Palmiter, R.D., Sandgren, E.P., Koeller, D.M. & Brinster, R.L. (1993a) Distal regulatory elements from the mouse metallothionein locus stimulate gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, **13**, 5266-5275.
- Palmiter, R.D., Sandgren, E.P., Koeller, D.M., Findley, S.D. & Brinster, R.L. (1993b) Metallothionein genes and their regulation in transgenic mice. In K.T. Suzuki, N.I., M. Kimura (ed.) *Metallothionein III*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 399-406.
- Penkowa, M., Carrasco, J., Giralt, M., Molinero, A., Hernández, J., Campbell, I.L. & Hidalgo, J. (2000) Altered central nervous system cytokine-growth factor expression profiles and angiogenesis in metallothionein-I+II deficient mice. *J Cerebral Blood Flow Metab*, **20**, 1174-1189.
- Penkowa, M., Carrasco, J., Giralt, M., Moos, T. & Hidalgo, J. (1999a) CNS wound healing is severely depressed in metallothionein I- and II-deficient mice. *J Neurosci*, **19**, 2535-2545.
- Penkowa, M., Giralt, M., Camats, J. & Hidalgo, J. (2002) Metallothionein 1+2 protect the CNS during neuroglial degeneration induced by 6-aminonicotinamide. *J Comp Neurol*, **444**, 174-189.
- Penkowa, M., Giralt, M., Moos, T., Thomsen, P.S., Hernández, J. & Hidalgo, J. (1999b) Impaired inflammatory response to glial cell death in genetically metallothionein-I- and -II-deficient mice. *Exp Neurol*, **156**, 149-164.
- Penkowa, M., Giralt, M., Thomsen, P., Carrasco, J. & Hidalgo, J. (2001) Zinc or copper deficiency-induced impaired inflammatory response to brain trauma may be caused by the concomitant metallothionein changes. *J Neurotrauma*, **18**, 447-463.
- Penkowa, M. & Hidalgo, J. (2000) Metallothionein I+II expression and their role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia*, **32**, 247-263.
- Penkowa, M. & Hidalgo, J. (2001) Metallothionein treatment reduces proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and apoptotic cell death during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Neurol*, **170**, 1-14.
- Penkowa, M. & Hidalgo, J. (2003) Treatment with metallothionein prevents demyelination and axonal damage and increases oligodendrocyte precursors and tissue repair during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Neurosci. Res.* **en prensa**.
- Penkowa, M., Hidalgo, J. & Moos, T. (1997) Increased astrocytic expression of metallothioneins I + II in brainstem of adult rats treated with 6-aminonicotinamide. *Brain Res*, **774**, 256-259.
- Penkowa, M. & Moos, T. (1995) Disruption of the blood-brain interface in neonatal rat neocortex induces a transient expression of metallothionein in reactive astrocytes. *Glia*, **13**, 217-227.
- Penkowa, M., Moos, T., Carrasco, J., Hadberg, H., Molinero, A., Bluethmann, H. & Hidalgo, J. (1999c) Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia*, **25**, 343-357.
- Pentreath, V.W. & Slamon, N.D. (2000) Astrocyte phenotype and prevention against oxidative damage in neurotoxicity. *Human Exp. Toxicol.*, **19**, 641-649.
- Perry, V., Bell, M., Brown, H. & Matyszak, M. (1995) Inflammation in the nervous system. *Curr opinion Neurobiol*, **5**, 636-641.
- Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Froelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P. & Palmiter, R.D. (1994) Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry*, **33**, 7250-7259.

- Ridet, J.L., Malhotra, A. & Gage, F. (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci*, **20**, 570-577.
- Rothwell, N.J. & Hopkins, S.J. (1995) Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. *Trends Neurol Sci*, **18**, 130-136.
- Samson, S.L. & Gedamu, L. (1998) Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **59**, 257-288.
- Searle, P.F., Davison, B.L., Stuart, G.W., Wilkie, T.M., Norstedt, G. & Palmiter, R.D. (1984) Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein I and II genes. *Mol Cell Biol*, **4**, 1221-1230.
- Sillevis Smitt, P.A., Blaauwgeers, H.G., Troost, D. & de Jong, J.M. (1992) Metallothionein immunoreactivity is increased in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, **144**, 107-110.
- Stichel, C. & Verner Müller, H. (1998) Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury. *Progr Neurobiol*, **56**, 119-148.
- Trendelenburg, G., Prass, K., Priller, J., Kapinya, K., Polley, A., Muselmann, C., Ruscher, K., Kannbley, U., Schmitt, A.O., Castell, S., Wiegand, F., Meisel, A., Rosenthal, A. & Dirnagl, U. (2002) Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, **22**, 5879-5888.
- Uchida, Y. (1993) Growth inhibitory factor in brain. In Suzuki, K.T., Imura, N., Kimura, M. (eds.) *Metallothionein III*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 315-328.
- Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y. & Tomonaga, M. (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, **7**, 337-347.
- van Lookeren Campagne, M., Thibodeaux, H., van Bruggen, N., Cairns, B., Gerlai, R., Palmer, J.T., Williams, S.P. & Lowe, D.G. (1999) Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 12870-12875.
- van Lookeren Campagne, M., Thiobodeaux, H., van Bruggen, N., Cairns, B. & Lowe, D.G. (2000) Increased binding activity at an antioxidant-responsive element in the metallothionein-1 promoter and rapid induction of metallothionein-1 and -2 in response to cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci*, **20**, 5200-5207.
- Vasák, M. & Kägi, J.H.R. (1994) Metallothionein. In King, R.B. (ed.) *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. J. Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 2229-2241.
- Vela, J.M., Hidalgo, J., González, B. & Castellano, B. (1997) Induction of metallothionein in astrocytes and microglia in the spinal cord from the myelin-deficient jimpy mouse. *Brain Res*, **767**, 345-355.
- West, A.K., Stallings, R., Hildebrand, C.E., Chiu, R., Karin, M. & Richards, R.I. (1990) Human metallothionein genes: structure of the functional locus at 16q13. *Genomics*, **8**, 513-518.
- Yagle, M.K. & Palmiter, R.D. (1985) Coordinate regulation of mouse metallothionein I and II genes by heavy metals and glucocorticoids. *Mol Cell Biol*, **5**, 291-294.
- Yamada, M., Hayashi, S., Hozumi, I., Inuzuka, T., Tsuji, S. & Takahashi, H. (1996) Subcellular localization of growth inhibitory factor in rat brain: light and electron microscopic immunohistochemical studies. *Brain Res*, **735**, 257-264.
- Yanagitani, S., Miyazaki, H., Nakahashi, Y., Kuno, K., Ueno, Y., Matsushita, M., Naitoh, Y., Taketani, S. & Inoue, K. (1999) Ischemia induces metallothionein III expression in neurons of rat brain. *Life Sci*, **64**, 707-715.
- Yuguchi, T., Kohmura, E., Yamada, K., Sakaki, T., Yamashita, T., Otsuki, H., Kataoka, K., Tsuji, S. & Hayakawa, T. (1995a) Expression of growth inhibitory factor mRNA following cortical injury. *J Neurotrauma*, **12**, 299-306.

- Yuguchi, T., Kohmura, E., Yamada, K., Sakaki, T., Yamashita, T., Otsuki, H., Wanaka, A., Tohyama, M., Tsuji, S. & Hayakawa, T. (1995b) Changes in growth inhibitory factor mRNA expression compared with those in c-jun mRNA expression following facial nerve transection. *Mol Brain Res*, **28**, 181-185.
- Zheng, H., Berman, N.E. & Klaassen, C.D. (1995) Chemical modulation of metallothionein I and III mRNA in mouse brain. *Neurochem Int*, **27**, 43-58.

Agradecimientos

Querría agradecer la ayuda de Milena Penkowa y de los estudiantes y colegas de mi laboratorio, sin los cuales nada habría sido posible. Gracias también a los diversos investigadores con los que he tenido el privilegio y el placer de colaborar, espero que sigáis contando conmigo.

Sitios WWW de interés

<http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>

<http://www.metallothionein.com>

Juan Hidalgo. Nació en 1960 en la provincia de Barcelona, España. Licenciado en Biología en 1982 por la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), doctorado en Fisiología Animal en 1986, estancia postdoctoral en el laboratorio de Justine Garvey, Syracuse University (NY, USA) en 1987, y profesor permanente en la UAB desde 1989.