

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



TESIS DOCTORAL

**Participación de la metalotioneína en el estado de anemia
ferropénica de la rata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Maria del Carmen Ingelmo Setien

Madrid, 2015

TP
1990
034

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Farmacia
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



24845374

**PARTICIPACION DE LA METALOTIONEINA
EN EL ESTADO DE ANEMIA FERROPENICA DE
LA RATA**

María del Carmen Ingelmo Setien
Madrid, 1990

Colección Tesis Doctorales. N.º 34/90

b 14 16 8078

• **María del Carmen Ingelmo Setien**

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria
Madrid, 1990
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-1179-1990**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

PARTICIPACION DE LA METALOTIONEINA EN EL ESTADO
DE ANEMIA FERROPENICA DE LA RATA

TESIS PRESENTADA PARA LA OBTENCION
DEL TITULO DE DOCTOR EN FARMACIA
POR LA
LDA: MARIA DEL CARMEN INGELMO SETIEN

MADRID 1.989

Mi agradecimiento al Dr. Manuel Benito de las Heras Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid . por haberme acogido en el Departamento y haber promovido y facilitado el desarrollo de la labor científica .

Al Dr. Bartolomé Ribas Ozonás , Director de este trabajo por su apoyo incondicional , su amistad y consejos .

Hago extensivo mi agradecimiento a todos los miembros del equipo por sus sugerencias y colaboración y a todo el departamento de Bioquímica y Biología Molecular .

A mis padres



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR

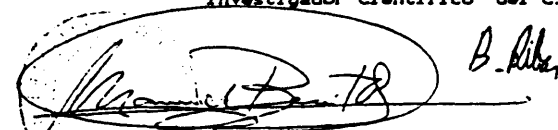
CIUDAD UNIVERSITARIA
TELEF. 243 02 02

Bartolomé Ribas Ozonas , Investigador Científico del
C.S.I.C. , adscrito al Instituto de Bioquímica
(Centro Mixto C.S.I.C. - U.C.M.) de la Facultad de
Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid .

CERTIFICA : La tesis presentada por la Licenciada en
Farmacia María del Carmen Ingelmo Setién , para
optar al grado de Doctor en Farmacia , con título
" Incidencia de la Metalotioneína en el
estado de Anemia Ferropénica de rata " , ha sido
realizada bajo mi dirección en el Departamento de
Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad
de Farmacia de la Universidad
Complutense de Madrid .

Y para que conste , y surta los efectos oportunos ,
firmo la presente en Madrid a 26 de Julio de 1.989

Fdo.: Bartolomé Ribas Ozonas
Investigador Científico del C.S.I.C.


Vº Bº Director del Departamento
Fdo.: Manuel Benito de las Heras

ABREVIATURAS

Mt : METALOTIONEINA

HPLC : CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

Fe : HIERRO

Cd: CADMIO

Cu: COBRE

Zn: ZINC

DTE: 1,4-DITIOERITRITOL

DTNB: ACIDO 5,5'-DITIOBIS-2-NITROBENZOICO

TRIS: AMINOMETILIDINTRIMETANOL

I N D I C E

INDICE

	PAGINA
I.-INTRODUCCION.....	1
II.-PARTE TEORICA.....	5
1.-EVOLUCION HISTORICA.....	6
2.-METODOS DE DETECCION.....	9
3.-CARACTERISTICAS QUIMICAS DEL HIERRO.....	10
3.1.-MICELA DE ALMACENAMIENTO DE HIERRO.....	12
3.2.-NIVELES DE FERRITINA EN INDIVIDUOS NORMALES SEGUN LA EDAD Y SEXO.....	16
4.-DISTRIBUCION INTERNA DEL HIERRO.....	18
5.-ORIGEN Y DESTINO DEL HIERRO PLASMATICO.....	19
6.-METABOLISMO HEPATICO DEL HIERRO.....	21
6.1.-CAPTACION DEL HIERRO POR EL HEPATOCITO.....	21
6.2.-LIBERACION DEL HIERRO POR EL HEPATOCITO.....	23
7.-ABSORCION Y EXCRECION DEL HIERRO.....	24
7.1.-ABSORCION.....	24
8.-METABOLISMO DEL HIERRO EN DUODENO.....	26
8.1.-REGULACION DE LA ABSORCION INTESTINAL DEL HIERRO.....	26
9.-FUNCION BIOLOGICA DE LA METALOTIONEINA.....	29
10.- COMPLEJOS DE HIERRO "IN VITRO".....	31
10.1.-COMPLEJOS DE HIERRO "IN VIVO".....	35
11.- METABOLISMO DEL HIERRO EN COMPLEJOS DE BAJO PESO MOLECULAR.....	38
11.1.-HIERRO DE BAJO PESO MOLECULAR EN LIQUIDOS BIOLOGICOS.....	38
11.2.-COMPLEJOS DE BAJO PESO MOLECULAR EN TRANSPORTE DE MEMBRANA	39
11.3.-INTERACCION ENTRE TRANSFERRINA , FERRITINA Y COMPLEJOS DE BAJO PESO MOLECULAR.....	41

	PAGINA
12.-FACTORES QUE REGULAN EL METABOLISMO DEL HIERRO.....	42
13.-MODELOS EN PLASMA DE CALCULO SIMILAR AL HIERRO DE BAJO PESO MOLECULAR	45
14.-DESIGNACION DE AGENTES QUELANTES PARA TRATAMIENTO DE SOBRECARGA DE HIERRO.....	46
15.-METALOTIONEINA	47
15.1.-NOMENCLATURA	48
15.2.-ESTRUCTURA Y UNION A METALES PESADOS.....	48
15.3.-POSIBLES FUNCIONES EN EUCARIOTES.....	50
15.4.-EXISTENCIA DE LUGARES DE UNION A HIERRO...	50
15.5.-ABSORCION ELECTRONICA.....	51
15.6.-DICOISMO MAGNETICO CIRCULAR	51
15.7.-BIOSINTESIS DE LA METALOTIONEINA Y SU REGULACION.....	52
15.8.-DEGRADACION Y EXCRECIÓN DE METALOTIONEINA.....	53
III.-MATERIAL Y METODOS	56
1.-INDUCCION DE ANEMIA FERROPENICA EN RATAS.....	57
1.1.-ANIMALES.....	57
1.2.-ALIMENTACION.....	57
1.3.-PREPARACION Y COMPOSICION DE LA DIETA DEFICIENTE EN HIERRO.....	58
1.4.-EXTRACCIONES.....	59
1.4.-ESTANDARIZACION DEL TRASTORNO ANEMICO.....	60
1.5.1.-HEMATOCRITO.....	60
1.5.2.-HEMOGLOBINA.....	61
1.5.2.1.-FUNDAMENTO.....	61
1.5.2.2.-REACTIVO DE TRABAJO.....	61
1.5.2.3.-TECNICA.....	62
1.5.3.-DETERMINACION DE HIERRO EN SUERO.....	63
1.5.3.1.-FUNDAMENTO.....	63
1.5.3.2.-TECNICA.....	63
1.5.4.-DETERMINACION DE LA CAPACIDAD TOTAL Y LIBRE DE FIJACION DE HIERRO EN SUERO...	66

	PAGINA
1.5.4.1.-FUNDAMENTO.....	66
1.5.4.2.-TECNICA.....	66
2.-CONTROL DEL CRECIMIENTO , DIETA Y AGUA DE BEBIDA DE LOS ANIMALES ANEMICOS Y CONTROL.....	69
3.-ELECCION DE LA DOSI OPTIMA DE CADMIO PARA INDUCCION DE METALOTIONEINA EN CEREBRO, MUCOSA INTESTINAL Y MEDULA OSEA.....	70
3.1.-GRUPO DE ANIMALES Y VIAS DE ADMINISTRACION.....	70
3.2.-DETERMINACIONES.....	72
3.2.1.-DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES. 72	72
3.2.1.1.-METODO DE LOWRY MODIFICADO	
POR HARTREE.....	72
3.2.1.2.-FUNDAMENTO.....	72
3.2.1.3.-TECNICA.....	73
3.2.2.-DETERMINACION DE CADMIO POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA.....	75
3.2.2.1.-DETERMINACION DE HIERRO POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA.....	76
3.2.2.2.-DETERMINACION DE ZINC POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA.....	77
3.2.2.3.-DETERMINACION DE COBRE POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA.....	78
3.2.3.-DETERMINACION DE METALOTIONEINA POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA.....	79
3.2.3.1.-FUNDAMENTO.....	79
3.2.3.2.-TECNICA.....	80
3.2.4.-DETERMINACION DE RADIATIVIDAD GAMMA.....	81

PAGINA

4.-PURIFICACION DE LA METALOTIONEINA EN CEREBRO , MUCOSA INTESTINAL Y MEDULA OSEA EN RATAS SOMETIDAS A DISTINTOS TRATAMIENTOS.....	81
4.1.-GRUPO DE ANIMALES Y TRATAMIENTO.....	82
4.2.-OBTENCION DEL EXTRACTO CELULAR.....	82
5.-FILTRACION MOLECULAR EN COLUMNA DE SEPHADEX G-50, EN CAMARA FRIGORIFICA A 4 ° C.....	83
5.1.-DETERMINACIONES.....	85
5.1.1.-DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES POR EL METODO DE LOWRY MODIFICADO POR HARTREE.....	85
5.1.2.-DETERMINACION DE Zn ,Cd Y Fe POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.....	86
5.1.3.-DETERMINACION DE GRUPOS DISULFURO POR ZAHLER Y CLELAND.....	86
5.1.3.1.-FUNDAMENTO.....	86
5.1.3.2.-TECNICA.....	87
5.1.4.-DETERMINACION DE METAALOTIONEINA POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.....	88
6.-SEPARACION DE ISOMETALOTIONEINAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION.....	89
6.1.-FUNDAMENTO.....	89
7.-ESTUDIO ESTADISTICO.....	93
IV.-RESULTADOS.....	95
1.-CONTROL DEL ESTADO ANEMICO.....	96
2.-CONTROL DEL PESO , ALIMENTACION Y BEBIDA.....	104
3.-ELECCION DE LA DOSIS DE CADMIO.....	112
3.1.-TRATAMIENTO CON HIERRO RADIATIVO.....	113
4.-PURIFICACION DE LA METALOTIONEINA EN RATAS CONTROLES Y ANEMICAS SOMETIDAS A TRATAMIENTO CON METALES.....	124

	PAGINA
V.-DISCUSION.....	178
VI.-RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	196
VII.-BIBLIOGRAFIA.....	199

I . INTRODUCCION

I. INTRODUCCION :

La participación del Cerebro en la Homeostásis del Hierro, permanece todavía desconocida, aunque se sospecha existe algún mecanismo involucrado, como puede ser , la participación de Transferrina y Ferritina , proteínas necesarias en todo proceso metabólico del mismo.

Tanto la homeostásis , como la absorción del Hierro en mamíferos , se ha cimentado en el proceso de absorción a nivel gastrointestinal (86)

Se ha postulado sobre la Ferritina , proteína acumulativa, esencial en el mantenimiento de los depósitos orgánicos del hierro , como equilibrante entre Ferritina y Transferrina en células de Mucosa Intestinal (124 , 9)

Investigaciones recientes , conducen a nuevos parámetros fisiológicos influyentes en la regulación Homeostática del citado elemento , respecto de nuevas proteínas , pudiendo ser relacionado con la actividad catabólica de la Metalotioneina , como quelato biológico , secuestrando y relacionando Zn y Cu.

Se considera al Cd , metal pesado inductor de anemia en ratas (151 , 40) así como en humanos (40bis) , induce transferrina plasmática en animales con anemia ferropénica (66) careciendo de participación en la síntesis de Hemoglobina (7bis)

La inducción de la anemia en el animal de experimentación , ha dado como resultado , la detección de Metalotioneina en Mucosa Intestinal (2 , 4) y posiblemente en cerebro . Es por lo que se plantea , la situación que esta proteína pudiera tener un papel importante en la Homeostasis Férrica .

El efecto del Cd se verifica obstruyendo la absorción del Hierro a nivel Intestinal (137). La competitividad entre Cd y Fe en absorción Intestinal , podría verificarse mediante inhibición de la Metalotioneina , bloqueada por el Cd , quedando de este modo , la citada proteína al margen de la absorción del hierro.

La Metalotioneina , pudiera ser un factor importante a considerar , en la explicación de la Etiopatogénia de numerosos síndromes neurológicos , cuya etiología actualmente permanece en suspense (57 , 58)

La absorción de metales pesados , esta aumentada en el proceso de anemia ferropénica (54 , 46) aportando la intervención de la Metalotioneina en el metabolismo y homeostasis del hierro.

Segun Vallee , (143) la detección , aislamiento y caracterización de la Metalotioneina , están estrechamente relacionados con la investigación de la función biológica del Cd en seres vivos.

En 1.957 la Metalotioneina , fue descubierta como proteína de Zn y Cd , en riñón de caballo (Margoshes , Vallee . 1.960)

Posteriormente fueron descubiertas , similares moléculas en especies Eucariotas , así como en distintas membranas y células

La Metalotioneina existe en varias isoformas , adjudicandosele varias acciones , aunque todavía no están establecidas.

Su estructura esta diseñada para unirse a metales pesados , de forma cooperativa , adoptando conformaciones , dependiendo de la unión a diferentes metales.

Este trabajo pretende mediante la inducción de Metalotioneina en tejidos , mediante administración de Cd y otros elementos (32, 100, 107, 11) detectar la posible participación de la Metalotioneina a nivel de Cerebro , Mucosa Intestinal y Médula Osea , en situaciones en las que sabemos estan incrementados sus niveles en otras partes del organismo.

Por ello , basándonos en que la absorción del hierro , es un problema regulado fisiológicamente para mantener el balance ideal , en el organismo , en cada momento . Por ejemplo en situaciones de deficiencia ferropénica , como es el caso de existir una anemia hipocrómica . La absorción de hierro esta incrementada..

Esta situación la consideramos ideal , para la realización de nuestro trabajo . ya que estarían aumentados todos los procesos de metabolización del hierro y nos permitiría detectar la existencia de Metalotioneina , mediante la presencia de Cd y Zn .

II. PARTE TEORICA :

II.- PARTE TEORICA :

1. EVOLUCION HISTORICA :

El término Metalotioneina (Mt) , se ha utilizado para designar a una proteína rica en grupos SH con Cd , Zn , Cu , procedente de la corteza renal de caballo . (1.960 según Kagi y Vallee)

En 1.974 Kagi y cols. , así como en 1.976 Kojima y cols. manifestaron las características de esta proteína , tales como :

- . Alto contenido en metales
- . Composición aminoacídica característica
- . Elevado contenido en Cisteína , carente de aminoácidos aromáticos e histidina.
- . Propiedades Ópticas peculiares de los grupos mercáptidos . (metal - tiolatos)
- . Única secuencia de aminoácidos , fijando la distribución de los grupos SH de la Cisteína.

La nomenclatura utilizada para las distintas Metalotioneinas y sus derivados , ha sido confusa durante bastante tiempo .

Actualmente basándonos en la composición y estructura de estas proteínas , en el pleno de la " I REUNION INTERNACIONAL " sobre Metalotioneina y otras proteínas de bajo peso molecular , capaces de ligar metales .

Celebrado en ZURICH en 1.978 , adoptando las recomendaciones siguientes :

- El término Metalotioneina (1.960) según Kägi y Vallee , se utilizará para todas aquellas proteínas que se ajusten a la definición dada anteriormente.
- El término " TIONEINA " se emplea para especificar la apoproteína de la Metalotioneina. La palabra "APOMETALOTIONEINA" podrá utilizarse para especificar la apoproteína.
- Cuando la Metalotioneina contenga más de un metal , por ejemplo 5.3 átomos gramo de Cd y 1.7 átomos gramo de Zn , se designará (Cd - Zn) - metalotioneina ; el orden de enumeración de los metales indicará su abundancia relativa.
- Cuando la composición en metales se desconozca o no revista interés , se utilizará el término "Metalotioneina".

La presencia de esta proteína , es muy amplia y generalizada , entre los vertebrados , también se ha encontrado en seres humanos , monos , caballos , vacas , ovejas , cerdos , perros , conejos , ratas , ratones , etc (1.979 , Nordberg y Kojima)

En mamíferos se refieren a las proteínas de Riñón , hígado e intestinos , aunque se ha señalado la presencia en otros órganos , tales como (bazo , cerebro , eritrocitos , páncreas fibroblastos)

Las cantidades de Metalotioneina presentes en los diferentes órganos , de especies diferentes es variable .

Al introducirse su biosíntesis por acción de algunos metales , tales como Zn y Cd , puede aumentar su concentración hasta 40 veces o más . (1.974 , Piotrowski y cols. Trojanowska)

En hígados de fetos existen elevadas concentraciones de Metalotioneina (1.977 , Bremner y cols. Weser ; 1.978 , Ryden y Deutsh ; 1.979 , Webb .)

Hay evidencia de la existencia de Metalotioneina , en algún "Filum" de invertebrados .

Recientemente se ha identificado metalotioneina , en el crustaceo "Scylla Serrata" (1.979 , Olafson y cols.)

En 1.975 , Prinz y Weser , purificarón una proteína con Cu , de peso molecular 9.500 daltons, procedente de un cultivo de *Sacharomices Cerevisiae* , incubado en un medio con Cu .

Las proteínas de esta Cu-proteína eran semejantes a las Metalotioneina de mamíferos.

Otra proteína de Cu se aisló , de cultivo de *Neurospora Crassa* . (1.978 , Ammer y cols , 1.979 , Lersch .)

Siendo el peso molecular de esta proteína , inferior al señalado para las otras metalotioneinas , su secuencia aminoácídica mantiene la posición de todos los residuos de Cisteína y de algunos de serina similares a los de la metalotioneina .

Los metales pesados que componen la biosfera , en proporciones minoritarias son :

Cd , Hg , Ni , Ag , Au .

Cu y Zn son esenciales nutrientes de las formas vivas , formando parte de algunas metaloenzimas , resultando tóxicos en cantidades elevadas.

El significado de estos elementos , en los organismos se desconoce .

La Metalotioneina es una proteina rica en Cisteina , cuya molécula forma parte del metabolismo intracelular de metales , con capacidad de unión a otros metales.

2. METODOS DE DETECCION :

La Metalotioneina se detecta preferentemente :

- . Espectroscopia de Absorción Atómica
- . Marcaje con Isotopos Radiactivos.

Por su alto contenido en S , métodos como :

- . Marcaje con S - 35 .

Métodos de separación :

- . Gel filtracion
- . HPLC
- . Gel Electroforesis

Metalotioneina en presencia de Zn y Cd produce 2 isoformas (15)

Isoforma I con un peso molecular de 6.200 daltons , constituida por 60 residuos y 12 cisteinas .

Semejante a la Isoforma II de peso molecular 6.300 daltons , con 61 residuos y 3 cisteinas.

3. CARACTERISTICAS QUIMICAS DEL HIERRO :

El Hierro es uno de los metales mas abundantes de la naturaleza , fundamentalmente se encuentra en estado férrico Fe (III) , sin embargo posee escasa biodisponibilidad , originando estados ferropénicos frecuentes en patología , más que en situaciones de sobrecarga férrica.

Se absorbe de forma ferrosa , el pH ácido del estómago hace que el hierro férrico , se transforme en ferroso , no obstante este proceso esta limitado por las condiciones fisiológicas y la dieta.

El Hierro funcional , en estado ferroso Fe (II) , representa aproximadamente el 75 % del metal total corporal , mayoritariamente en forma de hierro hémico , como componente del grupo Hemo (Protoporfirina - Hierro) .

La biosíntesis del Hemo es muy activa y eficiente Para reemplazar a la Hemoglobina de los hematies , se sintetizan en Médula Osea 300 mg de protoporfirina .

La porfirinosíntesis hepática es cuantitativamente inferior (100 mg diarios) dado que el turn-over hepático de las hemoproteínas es rápido .

Entre las hemoproteínas hepáticas (catalasas , citocromos mitocondriales y microsomales) el citocromo P - 450 supone 2 / 3 de las mismas .

También este hierro funcional está contenido en enzimas no hémicas , bien poseedoras del metal o bien requeridoras como cofactor : Enzimas con hierro no-hémico , por ejemplo Prolil y Lisil Hidroxilasas , Fenilalanina Hidroxilasa y Ribonucleótido Reductasa .

Diversas proteínas conteniendo hierro y azufre , localizadas en mitocondria hepática , están implicadas en la cadena de transporte electrónico , como mediadoras .

Otras forman parte integrante de numerosas enzimas , por ejemplo Xantín - Oxidasa .

El hierro de depósito (férrico) , se encuentra bajo la forma de Ferritina , o minoritariamente , en forma degradada de Hemosiderina .

La Ferritina (51) es una molécula hidrosoluble de forma esférica , constituida de envoltura protéica (Apoferritina) de 12 μ m de diámetro externo y 450.000 daltons de peso molecular .

La cubierta protéica , esta formada por 24 subunidades , de las cuales existen 2 subtipos diferentes respecto al peso molecular , contenido de aminoácidos y reactividad inmunológica .

La subunidad más pesada (H) unos 21.000 daltons es mas ácida predominando en la Ferritina del Corazón y del Riñón (quizá también en la ferritina sintetizada por las células tumorales) .

La subunidad más ligera (L) de 19.000 daltons , es más alcalina , predomina en la Ferritina de Hígado y Bazo (así como en estados de sobrecarga férrica)

La parte central de la molécula esférica de Ferritina tiene un diámetro aproximado de 7 um , pudiendo albergar de 4.000 a 5.000 átomos de Hierro (formando micelas de fosfato férrico hidratado) , comunicandose con el exterior a través de 6 canales

3.1 MICELA DE ALMACENAMIENTO DE HIERRO :

La cantidad mínima de 7 mg de hierro corporal , se encuentra " en tránsito " , mayoritariamente ligado a la Transferrina en fluidos extracelulares .

La Transferrina (1) está implicada en el transporte de hierro extracelular e intracelular .

Tradicionalmente podemos distinguir tres tipos de Transferrina :

- Transferrina Sérica Humana
- Ovotransferrina , aislada en el huevo blanco
- Lactotransferrin , aislada en diversos fluidos fisiológicos , de función aún incierta.

Las Transferrinas (1) son glicoproteínas , formadas por una única cadena polipéptica con una o más cadenas laterales de Carbohidratos (glicanos)

La Transferrina Humana (peso molecular de 79.550 daltons) , existiendo dos ramificaciones glicanos doblemente .

Dispone de dos lugares de unión al hierro (férrico) Sintetizada principalmente en Hígado , con vida media de 8 días en circulación .

La del hierro suele ser de 1 a 2 horas , realizando durante su existencia 100 ciclos , de transporte de hierro en interacción con las células receptoras .

En individuos normales , la transferrina sérica dispone de capacidad suficiente para fijar 330 ug de hierro / dl (capacidad total de fijación o CTF) , encontrándose saturada 1 / 3 de su capacidad .

Su concentración sufre variaciones circadianas y día / día ; incrementándose en deficiencia de hierro y disminuyendo en sobrecarga férrica.

La unión del hierro (férrico) a transferrina requiere la presencia de un anión (carbonato o bicarbonato) estabilizando dicha unión al actuar como puente de enlace entre el metal y la proteína.

La unión del hierro a la transferrina es pH dependiente , siendo máxima a pH 7 , inicialmente se disocia a pH 6.5 finalizando su disociación a pH 4.5.

Las constantes de unión no son idénticas para ambos lugares de acoplamiento , sugiriendo una posible preferencia de ingreso del hierro a determinados tejidos , respecto al lugar de unión que ocupa el metal.

La transferrina diférrica , es más eficaz como donante de hierro , que la monoférrica .

Se propone un modelo interpretativo (160) , de interacción transferrina - células .

La transferrina con hierro se unirá a receptores específicos situados en la superficie celular , quedando el complejo internalizado en la célula por endocitosis , para llegar al compartimento ácido no lisosomal , donde su pH (menor de 5.5) , induce la liberación del hierro de la transferrina , permaneciendo ligada a su receptor , escapando a su transferencia a los lisosomas , pudiendo sufrir proteólisis .

La transferrina libre de hierro , asociada a su receptor es reintegrada a la superficie celular , donde el pH neutro disocia el complejo , encontrándose el receptor dispuesto para su nueva actuación , liberando a la transferrina a la circulación para ser recargada nuevamente de metal .

Se ha comprobado la existencia de dichos receptores en membranas de células eritroides inmaduras , en placenta y otros tejidos .

El hecho que la transferrina resulte inaccesible a las proteasas , una vez unida a las células , sugiere la producción de endocitosis .

La colchicina ocasiona un efecto inhibitorio sobre la captación de transferrina , implicando a los microtubulos en este proceso .

Parte del hierro plasmático se encuentra en el hem y en la hemoglobina circulantes de forma ligada , respectivamente a hemopexina y a la haptoglobina

La ferritina serica cuantificable por las nuevas tecnologías , difiere de la tisular por estar glicosilada parcialmente y por su exiguo contenido en hierro . (156)

Su origen parece ser multicelular , siendo posiblemente sus fuentes las células del sistema mononuclear fagocítico y los hepatocitos . (51)

Su vida media se ha estimado en 50 horas (157)

Se ha confirmado que los niveles de Ferritina Sérica , tienen correlación con los depósitos corporales de hierro .

1 ug / l de Ferritina sérica representa 8 a 10 mg de hierro de depósito (o 140 ug por kg de peso corporal)

Su concentración sérica es constante en el transcurso de varias semanas , careciendo apenas de variaciones nictamerales .

Los valores medios en individuos normales esta en función de la edad y del sexo . (7)

3.2 NIVELES DE FERRITINA EN INDIVIDUOS

NORMALES SEGUN LA EDAD Y SEXO :

Valores inferiores a 20 ug / l en varones y 10 ug / l en mujeres , indican un deficit de hierro corporal . (78)

123 pacientes con patología gastroduodenal con ferritina sérica de 20 a 25 ug / l , siendo el limite inferior donde no resultaba patente el hierro en médula ósea . (55)

La circunstancia en que la ferritina sérica esta disminuida , es en deficiencia de hierro , la hiperferritinemia no resulta indicativo real de sobrecarga férrica . (95)

Como es el caso de hepatopatías activas , por liberación de ferritina de los hepatopatis activas , por liberación de ferritina de los hepatocitos dañados . (162)

O por alteración de los mecanismos implicados en la homeostasis de la ferritina . (87)

En procesos neoplásicos , particularmente en hepatopatomas al incrementarse la síntesis de las células tumorales (22) y en la inflamación como reactante de fase aguda (77)

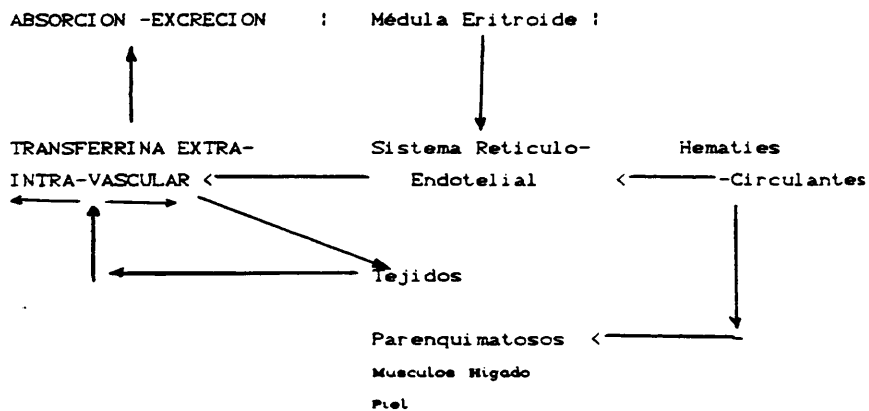
Comparación según POWELL (111) entre Transferrina y Ferritina séricas :

	TRANSFERRINA	FERRITINA
Peso molecular	80.000 D.	450 000 D.
Vida media	8 días	50 horas
Atomos Fe / molec.	2	4.000
Lugar de síntesis	hepatocito	hepatocito SRE , mayoria cel.
Lugar de degradación	macrófago	hepátocito
Función	transporte	desconocido
Comportamiento como reactante en fase aguda	no	si
Síntesis en situación de hematosiderosis	descendida	aumentada

4. DISTRIBUCION INTERNA :

Podemos englobar los orígenes y destinos del Hierro plasmático , cuyo conocimiento avanza debido a las técnicas Ferroquinéticas . De acuerdo con los resultados obtenidos por BOTHWELL y cols. (13)

Intercambio entre los Diferentes Compartimentos corporales :



(DISTRIBUCION ORGANICA DEL HIERRO)

5. ORIGEN Y DESTINO DEL HIERRO PLASMÁTICO :

El Sistema Reticulo Endotelial es el portador de hierro al plasma , procedente en mayoría de la hemoglobina y minoritariamente de lugares de almacenamiento.

Los tejidos con reserva de hierro , contribuyen en una proporción del 5 % del turn - over del hierro plasmático.

La Absorción Intestinal oscila entre el 3 y 4 % .

Más del 80 % del hierro plasmático tiene su destino final en el eritrón , incorporándose mayoritariamente a la hemoglobina.

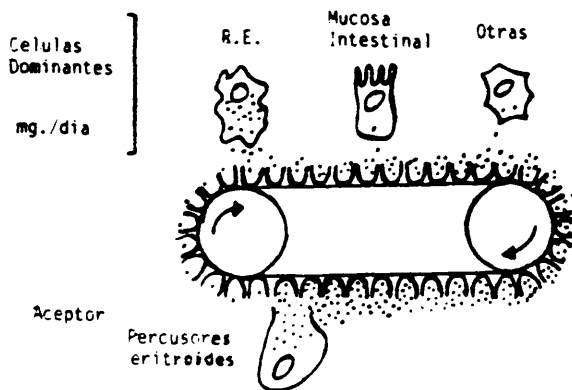
Las células rojas mueren intramedularmente , o son fagocitadas por el Sistema Reticulo Endotelial , o su hemoglobina es liberada a plasma donde es captada por Haptoglobina y transportada a los Hepátocitos .

Otra ruta cuantitativamente significativa , corre a cargo de las células parenquimatosas , principalmente los Hepátocitos .

Una exigua cantidad de hierro abandona el plasma , pasando a tejidos extravasculares

El principal mecanismo de ingreso de hierro plasmático a los tejidos , esta en función de la interacción de la Transferrina mono o diférrica , con receptores específicos de membrana , cuyo determinante resulta de la cantidad relativa de metal aportado a un tejido determinado . (39)

BOTHWELL (13) ejemplariza , como una cinta transportadora manejada por la captación del hierro por parte del eritrón . de forma que la cantidad de metal proporcionada en cada momento por las células donantes , depende de la cantidad de hierro retirada por los precursores eritroides .



Cadena de transporte del hierro

CADENA DE TRANSPORTE DEL HIERRO DESDE LAS CELULAS DONANTES HASTA LOS PRECURSORES ERITROIDES

6. METABOLISMO HEPATICO DEL HIERRO :

El Hígado contiene 0.4 g del hierro total corporal. Solo 1.5 % de esta cantidad se encuentra en células del Sistema Reticulo Endotelial , que reciben el metal , a partir de la destrucción de hematies senectos , y en menor proporción del hierro circulante unido a Transferrina .

Solo una pequeña cantidad del hierro queda almacenado en forma de Hemosiderina (en menor grado de Ferritina) , el resto es liberado a la circulación .

Las células del Sistema Reticulo Endotelial no son capaces de captar hierro a partir de los complejos Hemo - Hemopexina y Hemoglobina - Haptoglobina (Hb - Haptoglobina)

6.1.- CAPTACION DEL HIERRO POR EL HEPATOCITO :

El Hierro accede al Hepátocito por varios mecanismos :

a) El hierro ligado a Transferrina , puede unirse a un receptor específico de membrana (R1) junto con el que es internalizado , evitando su paso por los lisosomas que degradarian la Transferrina

Si la Transferrina plasmática se encuentra saturada en mas del 30 % , el hierro unido a Transferrina accede al interior del Hepátocito , mediante un mecanismo de pinocitosis inespecifica quedando degradada la Transferrina en los Lisosomas .

La primera modalidad es saturable y específica merced a la existencia de unos 37.000 a 60.000 receptores en Transferrina diférrica. (159)

b) Existe un receptor específico para el complejo Hemo-Hemopexina (R2) que penetra en la célula por endocitosis , siendo el Hemo degradado por la Hemo-oxigenasa microsomal , retornando intactos Hemopexina y receptor al exterior de la célula

En situaciones de exceso plasmático de Hemo (crisis hemolíticas de una anemia de células falciformes) puede existir una degradación significativa de la Hemopexina (42) descendiendo sus niveles plasmáticos al superarse su síntesis hepática ; en las citadas circunstancias este mecanismo de captación de hierro por el hepatocito alcanza valores significativos

c) El complejo Hb-Haptoglobina posee un receptor específico (R3) , pudiendo ser degradado en lisosomas liberando Hem y restos protéicos , o ser transferido a bilis recuperando su receptor .

En situaciones de Hemólisis intravascular pudiendo ocasionar una degradación de la Haptoglobina con la correspondiente disminución de sus niveles plasmáticos .

d) Cada hepatocito de rata dispone de unos 30.000 receptores de membrana para la Ferritina circulante (R4) (87) .

En circunstancias fisiológicas , la Ferritina sérica contiene exigua cantidad de metal .

El hierro internalizado a partir de estos mecanismos , según parece forma parte , de un pool intermedio ligado a Ferritina , previamente al pool de hierro en tránsito , denominado " Pool quelable de bajo peso molecular " , alrededor del 20 % del metal hepatocitario .

Aún no se ha determinado la composición de este pool lábil , se consideran sustancias constituyentes actuando como quelantes y / o transportadores del hierro férrico o ferroso : Guanosin trifosfato , Adenosin trifosfato , Adenosin difosfato , pirofosfatos , 2,3 difosfoglicerato , Acido Ascorbico , Glutación Cisteina , Glucosa , Fructosa , Citrato , Lactosa y Riboflavina (65).

También se ha identificado en células hematopoyéticas , enterocitos , leucocitos perifericos y macrofagos alveolares .(6)

Partiendo de este pool de bajo peso molecular , el hierro se dirigira a depósitos (ferritina y hemosiderina) o utilizado en biosíntesis de Hemo-proteínas (citocromos , catalasa peroxidasa) así como otras proteínas que contienen hierro en su molécula , (como enzimas no hémicas y proteínas que además contienen azufre) .

6.2. LIBERACION DE HIERRO POR EL HEPATOCITO :

En circunstancias normales , la concentración del hepatocito es inferior al 5 % , pudiendo ser incrementado este porcentaje , en situaciones de demanda de hierro.

Los mecanismos de liberación hepática del metal , según BAKER (6) , la Apotransferrina es efectiva para movilizar los depósitos de hierro de los hepatocitos aislados , que los quelantes exogenos , con lo cual sugiere la liberación del metal por mediación de los receptores de Transferrina .

El vaciamiento de los depósitos hepáticos de hierro , se inicia a partir del pool quelable de bajo peso molecular posteriormente de la Ferritina .

La contribución del hepatocito a la Transferrina plasmática es doble , recuperandose por un lado esta glicoproteina por externalización , una vez cedido el hierro que portaba ; por otra parte los polirribosomas libres del reticulo endoplasmático rugoso (R.E.R.) la sintetizan de forma activa .

7. ABSORCION Y EXCRECION DE HIERRO :

7.1 ABSORCION :

Una dieta occidental contiene de 10 a 20 mg. de hierro (7 mg / 1.000 cal.) absorbiendose 1 mg .

La cantidad absorbida depende de :

a) Dieta
b) Contenido corporal de hierro , existiendo una relación inversa entre absorción y cantidad de hierro medular , o niveles de Ferritina sérica .

c) Eritropóyesis , en los animales .

La composición de la dieta apenas afecta a la absorción del hierro hémico , para lo cual el organismo humano se encuentra bien dotado genéticamente , debido a la existencia de receptores especificos en membrana luminal del enterocito .

El hierro no hémico es absorbido con dificultad (quizá captado por el complejo apotransferrina - receptor) , ejercen un efecto inhibitorio sobre su disponibilidad , multitud de ligandos tales como : Carbonatos , Oxalatos , Fosfatos , Fitatos , Pectina salvado y Tanatos del Te indio .

Su absorción está favorecida por la Vitamina C , por su poder reductor como por su capacidad de unirse equimolecularmente al hierro .

El ácido clorhídrico (HCl) gástrico favorece la absorción del hierro hémico , porque proporciona un pH bajo evitando la formación de complejos poliméricos de hierro.

SKINE (129) Comprobó que la absorción del hierro No--Hémico de la dieta se reducía en los tratamientos con Cimetidina y alcalinos .

7.2. EXCRECIÓN :

En un varón adulto , las pérdidas de hierro diarias ascienden de 0.9 a 1 mg . Procedente en su mayoría del tracto Gastrointestinal , partiendo de hemorragias mínimas procedentes de individuos normales (0.45 mg) así como del metal excretado por bilis , o por descamación celular (0.15 mg)

La eliminación a través de la piel , oscila entre 0.2 y 0.3 mg , por orina es de 0.1 mg .

8. METABOLISMO DEL HIERRO EN DUODENO :

El metal es absorbido a nivel de Duodeno y Yeyuno .
Una vez en el interior del enterocito , el hierro pasa a formar parte de un pool lábil de hierro-transferrina y de allí tiene tres puntos de destino :

- 1) Mitocondria
- 2) Transferido a la circulación portal considerando la fracción de hierro absorbido con rapidez.
- 3) Almacenado en forma de Ferritina . De este depósito pasa al macrofago de la lámina propia en forma de ferritina o de hierro-transferrina ; ésta última sería la responsable de la fracción de hierro de absorción rápida pasando con facilidad a la circulación portal .
El hierro retenido en el macrofago es en forma de Ferritina-Hemosiderina ingresando más lentamente en la circulación portal o transferido a las células calciformes para su excreción intestinal .

8.1. REGULACION DE LA ABSORCION INTESTINAL

DEL HIERRO :

Existen multitud de hipótesis humorales y locales para tratar de explicar el mecanismo control de absorción .

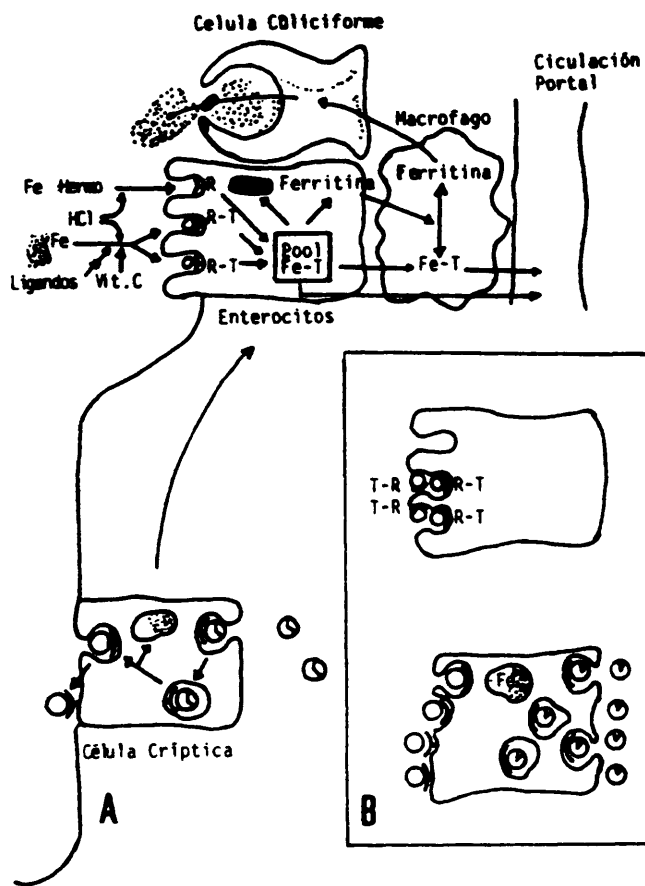
Actualmente se puede considerar por las variaciones cuantitativas de la Transferrina de Mucosa . (123)

Segun REFSUM Y SCHREINER (116) las células cripticas intestinales (no absortivas) reciben el hierro endógeno por endocitosis del complejo receptor-transferrina tras liberar el hierro , la apotransferrina con su receptor son externalizados hacia la superficie luminal , una vez alcanzada la posición absortiva de la vellosidad intestinal por el enterocito , la apotransferrina se encuentra disponible para captar el hierro de la dieta .

En situaciones deficitarias de hierro , la transferrina plasmática se encuentra poco saturada , por lo tanto mas moléculas de transferrina endógena , seran endocitadas para aportar a la célula criptica la cantidad de hierro necesaria ; incorporando la citada célula mayor dotación de apotransferrina , cuando se encuentre en posición absortiva , captara mayor cantidad de hierro en la dieta .

Para REFSUM y SCHREINER (116) , la saturación de transferrina plasmática determina , la cuantia de absorción intestinal de hierro .

Los niveles de ferritina sérica regulan el comportamiento de los macrofagos de la mucosa intestinal .



Intercambio externo del hierro a nivel del epitelio intestinal

9.-FUNCION BIOLÓGICA DE LA METALOTIONEINA :

Proteínas constituidas por azufre y metales , de particular interés, en distintos aspectos biológicos.(58 , 53 , 53)

Dichas son las únicas provistas de Cd , como constituyente opcional de la Metalotioneina , así como Cu y Zn. (70 , 71)

Se sospecha intervienen en el mecanismo de detoxificación , de metales TRAZA , tanto esenciales como no esenciales .

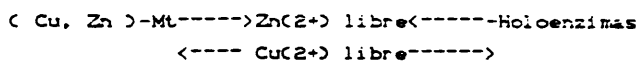
Su aspecto Fisiológico en mamíferos , según parece , se centra en la Homeostasis de Cu y Zn , dado que facilita estos iones metálicos , en casos de necesidad para la síntesis de componentes celulares Metal-Dependientes , como metaloenzima , ácidos nucleicos , estructuras supramoleculares , secuestrandoles de forma Química Inocua , en caso de exceder de la concentración Crítica Intracelular. (24)

La Zn-Metalotioneina puede transferir Zn a apoenzimas , "in vitro", en condiciones determinadas. (14)

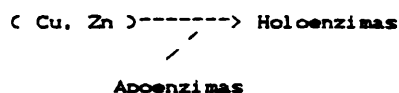
El grupo de Winge , estudio "in vitro", la reactivación de apoenzimas ,utilizando Cu-Metalotioneina ,asi como otras Metalotioneinas . Por mediación de Cu-Metalotioneina , se observó , transferencia de Cu a la Anhidrasa Carbónica .

Existen 2 posibles Mecanismos para la transferencia de Cu y Zn , desde Metalotioneina a apoenzimas (47)

Mecanismo I :



Mecanismo II :



Los metales pesados , componentes minoritarios de la Biosfera son :

Cu , Cd , Zn , Ag , Hg , Au , Ni y Co .

Cu y Zn , son oligoelementos esenciales en las diversas formas de vida , participando en variadas reacciones Enzimáticas, resultando tóxicos , al presentarse en proporciones inadecuadamente elevadas. (2)

Algunos iones mencionados , tales como (Cd , Au , Ag , Hg) se desconoce su función esencial , presentes en cantidades pequeñas y variables , siendo potentes toxinas.

Los conocimientos , sobre la utilización , de estos metales por los seres vivos , son exigüos.

No han sido identificadas , moléculas involucradas en el transporte a través de membrana ; el ión ligando inicial , activa metaloenzimas o controla el estado de valencia .

Actualmente , la única molécula con un clarificado papel , en el metabolismo intracelular de metales , es la Metalotioneina. (53)

La capacidad de activación génica , de metales de transición y post-transición , para inducir la síntesis de Metalotioneina , sugiere parcialmente , una respuesta rápida de un eficiente mecanismo de Retroalimentación Biológica , supervisando , la concentración intracelular de iones metálicos , químicamente reactivos . (104 , 137 , 28)

No obstante , la inducción de Metalotioneina es eficiente por :

- . Hormonas Glucocorticóides. (37)
- . Stress Fisiológico. (99 , 130)
- . Interferón. (45)
- . Endotoxinas Bacterianas. (28)
- . Agentes Alquilantes. (29)
- . Interleucina I. (72)

Nos inclinan a pensar , que estas proteínas , pueden intervenir en procesos Fisiológicos , aún desconocidos .

En 1.981 , Labadie mostro mayor cantidad de Cu-Metalotioneina , en cultivos de Fibroblastos , en la piel de pacientes con enfermedad de Menkes , que en cultivos procedentes de sujetos normales .

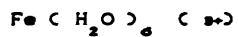
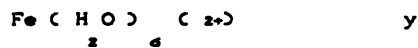
Permanece en suspense , si las cantidades de Metalotioneina incrementadas son la primera carencia , en la citada enfermedad , o en consecuencia son secundarias en el metabolismo anormal , o transporte del Cu. (79)

Recientemente , se han encontrado , ciertas similitudes entre los genes que codifican la Metalotioneina y la Somatostatina . (84)

De tal modo , se ha demostrado la flexibilidad , en los requisitos estructurales de la Metalotioneina , como función detoxificante del Cu , así como la Metalotioneina procedente de Levaduras , con efecto detoxificante en ciertas condiciones . (33)

10.- COMPLEJOS DE HIERRO " IN VITRO " :

En 1.974 , Spiro y Saltman , postularon 2 estados de oxidación de iones hierro en solución acuosa :



Complejo octaédrico hidrolizado , polimerizable a valores de pH fisiológico (7)

Cuando las moléculas de agua son reemplazadas por otros ligandos , se originan complejos estables .

Los complejos de Fe(III) alojan ligandos tales como , oxígeno , citratos , fosfatos , fenoles o carbohidratos .

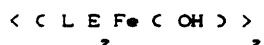
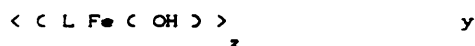
A su vez el Fe(II) selecciona , nitrógeno o nitrógeno con oxígeno .

El potencial necesario para reducir el Fe(III) a Fe(II) en líquidos biológicos y plasma , varía desde 770 mv a 360 , dependiendo de los iones metálicos .

Favoreciendo la lipofilia los metales próximos y la estereoquímica de grupos coordinados , transformándose en macromoléculas , ocasionando variaciones de potencial Redox superiores a 1 voltio .

Son estables en condiciones ácidas ; la pérdida de protones de las moléculas coordinadas de agua , limita los átomos de oxígeno intercambiados por los iones metálicos .

Fe(III) comúnmente presenta dimerización , originando especies tales como :



Las polimerizaciones más frecuentes surgen entre Fe(III) y especies Hidroxido originando estructuras polinucleares cerradas .

Dificultades de mantenimiento en solución acuosa , de complejos férricos de bajo peso molecular , ha sido subsanada parcialmente por la función de la Ferritina , en especies de células reservorio .

Se suprime la Hidroxipolimerización , cuando los ligandos ocupan las posiciones de coordinación , con otro ión Hierro , presentandose complejos mononucleares a pH fisiológico .

Dichas especies , están constituidas por agentes quelantes polidentados , facilitados por microorganismos .

Según Perrin , 1.964 , el aumento total de metal o ligando existente , impone un limite en la formación del complejo . Si un componente varia , se altera la eficacia de su coordinación (con las correspondientes implicaciones sitio-efecto)

Perrin en 1.970 , un ligando puede ser descrito como , una base blanda , si el átomo donador posee baja electronegatividad , siendo facilmente oxidado , porque los electrones , procedentes de los orbitales de valencia se cedén ligeramente .

Una base dura , dona un átomo de baja polarizabilidad , resistente a la oxidación , dotado de elevada electronegatividad , provisto de orbitales vacios de alta energía .

Similarmente , un ión metálico es catalogado como ácido blando , cuando la densidad de carga es baja ; de gran tamaño excitando con facilidad otros electrones .

Un ión metálico es considerado como ácido duro , cuando esta cargado positivamente ; es pequeño y no se excita por otros electrones .

Los más estables son los originados por un ácido duro y una base blanda , o un ácido blando y una base dura .

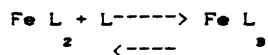
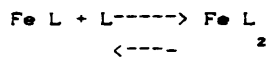
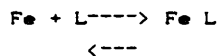
La aplicación del concepto HSAB a complejos de hierro , racionaliza , algunas propiedades observadas . Donde el Fe(III) es duro , Fe(II) en cambio no . Esto es debido a , la fuerte afinidad del hierro en su más alto estado de oxidación , con oxígeno como donador .

El más elevado estado de oxidación , puede ser preferente en acuosos , en contraposición a no acuosos . Un cambio a pH superior puede ocasionar , efecto similar.

La estabilidad conferida a complejos de Fe(III) sobre los de Fe(II) e iones metálicos divalentes de transición , resulta de incrementar la carga adicional relativa a ligandos duros .

Los complejos estables de Fe(II) , comparado con un 1 rango de metales de transición , en la secuencia de Irving-Williams (Mn < Fe < Co < Ni < Cu > Zn) se encuentra incrementada con ligandos blandos .

En general , reemplazamientos de moléculas de agua , limita los iones de Fe , por agentes complejantes , previendo un equilibrio competitivo . Implícitamente , el solvente ocupa sitios no coordinados por otros ligandos , pudiéndose expresar :



Otro equilibrio característico , por una constante de estabilidad β , se refleja , uniéndose acidamente el ligando sobre las moléculas de solvente :

$$\beta_1 = \frac{\langle \text{ML} \rangle}{\langle \text{M} \rangle \langle \text{L} \rangle}$$

$$\beta = \frac{\langle ML \rangle_2}{\langle M \rangle \langle L \rangle_2}$$

En presencia , de dos o mas agentes quelantes , se establece otro equilibrio competitivo , pudiendo resultar en coexistencia la variedad de complejos , particularmente , especies ternarias , envolviendo 2 especies diferentes de ligandos . Es importante resaltar , la calidad del complejo formado, esta en función de las concentraciones absoluta y relativa .

Otro factor digno de mención es el pH . A pH alto , en presencia de iones hidroxid , se favorece la hidrólisis del ión metal .

10.1 - COMPLEJOS DE HIERRO " IN VIVO " :

El papel Bioquímico del Hierro , se ha manifestado en la actividad de sus metaloproteínas . Estan involucradas en el transporte de oxígeno y almacenaje , con el correspondiente intercambio electrónico .

En 1.977 May et al . Establecieron la siguiente clasificación de complejos biológicos , atendiendo a el peso molecular y labilidad .

Inercia y Labilidad de Proteinas "In Vivo" .

Inerte y / o

Labil y

Termodinamicamente

Termodinamicamente

No - Reversible :

Reversible :

Fe
Hemoglobina

Mioglobina
(Ferritin)

Bajo p. mol.
Trans \rightarrow Fe(2) com. \rightarrow
 \rightarrow \langle Fe (H₂O) \rangle \leftarrow

Cu
Ceruloplasmina

(Metalotionina)

Suero \rightarrow Cu(2) com. \rightarrow
 \rightarrow \langle Cu (H₂O) \rangle \leftarrow

Albúmina

Zn
 α macroglobina
2

Suero \rightarrow Zn(II) com. \rightarrow
 \rightarrow \langle Zn (H₂O) \rangle

(Metalotionina)

Albúmina

Zn
 α macroglobulina
2

Bajo p. mol.
Suero \rightarrow Zn(II) com. \rightarrow
 \rightarrow \langle Zn (H₂O) \rangle

(Metalotionina)

Albúmina

Las metaloproteínas , son complejos lábiles , de bajo peso molecular , iónes acuo metálicos .

Otro tipo de complejos , se presenta , cuando el metal es inerte o no reversible , encontrandose unido a la proteína , no pudiendose movilizar , salvo en el caso de producirse fractura estructural .

Las citadas , actuan de reservorios para elementos de transición , estableciendo un equilibrio en aquellos complejos de metal lábil .

Los elementos de transición , como iónes metálicos acuosos , deben estar presentes , a concentración baja ; por razones termodinámicas , para poder intervenir en procesos biológicos .

Según May et al. en 1.978 , Fe(III) y Mn(II) , forman complejos de bajo peso molecular , disponiendo de la cinética adecuada , para atravesar membranas biológicas .

Transferrina se une a células de membrana facilitando , su entrada en los reticulocitos por endocitosis .

La función de la Ferritina , puede ser comparada con Metalotioneina , por presentar tendencia a comportarse como reservorio ; con otros elementos pesados , a concentraciones buffer .

En 1.977 , Jacobs postuló , el hierro como ligando de proteínas , de bajo peso molecular . Involucrado en el transporte de membrana a mitocondria , para la síntesis y almacenaje de Metaloproteína .

Pudiendo actuar como intermediario , ligando macromoléculas específicas .

Segun Jacobs en 1.977 , existe un equilibrio desplazado , entre la fracción de bajo peso molecular y (a) Transferrina o agentes quelando células superficiales .

Lipschitz et al. En 1.971 , y (b) Ferritina dentro de células .Esto probablemente se debe , a equilibrio redox , entre compuestos de Fe(II) y Fe(III) , en respuesta a cambios de potencial en el medio .

11.-METABOLISMO DEL HIERRO EN COMPLEJOS

DE BAJO PESO MOLECULAR :

11.1 - HIERRO DE BAJO PESO MOLECULAR EN LIQUIDOS BIOLOGICOS :

Las propiedades patentes , ligando metal de macromoléculas , en liquidos biológicos , acoplado a una baja concentración total de iones metálicos de transición ; "in vivo" , origina limitados complejos de las citadas características . Sin embargo , estas concentraciones son relativamente mas elevadas , respecto las correspondientes a los complejos de bajo peso molecular , de iones metálicos acuosos .

En equilibrio con el oxígeno atmosférico , el Fe(II) puede participar en estructuras de proteínas , siendo estable en la configuración de alto spin .

En plasma , bajo condiciones de equilibrio , se produce complejos de hierro , con ligandos de bajo peso molecular en estado de oxidación (+ 3) ; porque hay concentraciones equivalentes de Fe acuoso , siendo relativamente bajos los efectos del potencial Redox .

11. 2 - COMPLEJOS DE BAJO PESO MOLECULAR EN TRANSPORTE

DE MEMBRANA :

Albert en 1.973 , postuló : La elevación de metales desde el tracto gastrointestinal y su correspondiente distribución en los compartimientos orgánicos , dependiendo fundamentalmente , de la facilidad con que atraviesan las membranas biológicas .

Proteínas ligando en el interior de la célula , pueden contribuir a elevar la red del metal . Obteniéndose como resultado síntesis de metaloproteína con interacciones de proteína lábil . De este modo , el transporte puede ser alterado , a consecuencia de la inhibición en síntesis proteica , por un metabolito venoso y por privación de la energía metabólica .

La complejación del ión metálico puede ser pasiva , en contra de gradiente de concentración , específico de aquellos iones dependientes del potencial Redox .

May et al. en 1.978 , sugirieron mecanismos de transporte activo , para iones metálicos de transición , debido a , restos inequívocamente establecidos .

Las membranas semipermeables , carecen de actividad en el transporte de metales de transición . La distribución de estos metales en los diferentes compartimientos impone condiciones respecto a la lipofilia de los complejos de bajo peso molecular , formados en distintos líquidos biológicos , no limitando la proteína ni los iones libres, pudiendo penetrar en las membranas directamente .

Hay evidencia , de complejos lipofilos de Fe(III) atravesando biomembranas , con la misma ruta de otros complejos metálicos .

Charley et al. en 1.963 ; David and Deller en 1.967 ; Bates et al. en 1.972 afirmaron que la absorción de Hierro oral , esta favorecida por Fructosa .

Brown et al. en 1.978 , también está favorecida por acetohidroxamato .

May et al en 1.978 , en ambos casos la transferencia ,esta incrementada a través del epitelio , en función del complejo neutro predominante en el liquido intersticial .

Según hechos experimentales , la distribución de hierro en el organismo , asi como su correspondiente excreción , después de administración intravenosa de quelatos férricos ,esta determinada por los complejos lipofilicos .

Princiotto et al. en 1.964 ; Rubin et al. en 1.970 , vieron en especies no polares , su retención por Hígado , siendo excretadas por Bilis , quedando los complejos retenidos en espacio extracelular , hasta ser filtrados por Riñón en orina .

Se ha sugerido que el Fe(II) , en procesos metabólicos , envuelve de forma rápida a la célula , desprendiendose lentamente en la superficie .

El hierro inicialmente sufre un transporte pasivo y bidireccional , dependiente de escasa energía , invertida en su retención a nivel mucosal .

Brown , Justus , Pearson , Reich , Smith , demostraron la quelación del hierro , en Mucosa se produce unidireccionalmente , por difusión pasiva .

May et al. Vieron que el Fe(II) puede ser transportado a través del epitelio , en complejos de bajo peso molecular .

11.3 - INTERACCION ENTRE TRANSFERRINA , FERRITINA

Y COMPLEJOS DE BAJO PESO MOLECULAR :

El hierro , reversiblemente está limitado a transferrina , pudiendo ser removido fuertemente por agentes , siendo quelado en condiciones estrictas .

Warner , Weber , Aasa et al. , Bates et al. , Aisen et al. , manifestaron que la dificultad estriba , en aquellos pequeños ligandos que pueden penetrar en la matriz proteica , como especie ternaria intermedia , uniéndose al ión metal mas que la Transferrina .

Dichos como Citrato y Acido Nitrilotriacetico (NTA) se han utilizado como medio de transferencia , entre el hierro y moleculas de Transferrina .

Segun Ganzoni et al. , esto demuestra que las concentraciones de complejos de bajo peso molecular , en equilibrio con hierro y transferrina , ejercen su efecto en el comportamiento del sistema .

Cavill , Bates y Schlabach , han mostrado que la naturaleza de complejos de bajo peso molecular , ocurre preferentemente abasteciéndose del hierro proteico . Y los iones férricos originan ligandos , que inicialmente ocupan sitios termodinámicamente débiles . Esto resulta significativo , dado que el cambio se produce lentamente .

Considerando , si el efecto se debe a la naturaleza , de complejos de hierro de bajo peso molecular , o a una interacción del anión unido al sitio de transferrina ; se acepta una distribución al azar del hierro .

La relación entre Ferritina y complejos de hierro de bajo peso molecular , ha estado sujeto a controversia . No obstante , parece claro , la síntesis de Ferritina inducida , por un aumento de labilidad , en el pool intracelular del hierro , compensado por complejos de bajo peso molecular .

Este pool puede ser alterado por agentes extracelulares , se asume que pueden derivar del hierro de Ferritina en determinadas condiciones fisiológicas .

Crichton , sugiere que el sistema macromolecular , contradice el principio de CHATELIER'S , donde el hierro mas saturado procede de Ferritina .

Munro y Linder , proponen la posibilidad de alcanzar el equilibrio aparentemente , en procesos de síntesis de Ferritina , formación de Hemosiderina , unión lábil de metal , desprendiendo el correspondiente hierro en el citoplasma celular .

12.- FACTORES QUE REGULAN EL METABOLISMO

----- DEL HIERRO : -----

La manera de controlar el metabolismo del hierro , ha sido el punto focal desde la revisión de McCance y Widdowson , concluyendo , la capacidad limitada del organismo para excretar dicho metal . Desde un punto de vista químico , la influencia de tal regulación es en condiciones de equilibrio .

Forth y Rummel , propusieron el siguiente diagrama esquemático , de reacciones de cambio de hierro en células :

Flujo

atribuible

|
|
|

rapido

|
|
|

Cambio

Cambio

<----(lento)---->

Rápido

lento

----(rapido)---->

Fe . pool

Fe . pool

^ |
|

lento rapido

| |
| |
| |
| |
| v

Transferrina

en Plasma

Limitado a equilibrio y términos cinéticos , evitándose especies de transporte de hierro , identificándose como Ferritina , el cambio lento de pool de hierro .

Considerando , el cambio rápido de pool de hierro celular , el hierro citoplasmico esta limitado por la proteina carrier , modificado en función del modelo cuantitativo en rápido equilibrio de bajo peso molecular .

El flujo atribuible , se refiere , al hierro absorbido del liquido intestinal , o liberado por Hemoglobina .

Smith et al. , sugieren el equilibrio , entre Transferrina en plasma y pool de hierro rápidamente variable de forma intracelular ; requiere un feed back lento , cuando circula Transferrina o por elevación de hierro , durante el proceso de formación de la célula .

Récientemente , se pretende hallar el mecanismo control de absorción de hierro , probablemente inconcluso , por ser determinado para cada tipo de etapa .

May et al. , piensan que algunos factores involucrados en dicha absorción , no son determinados por un tipo de proceso , como sucede en el caso referido , a la célula mucosal .

En situación de pool de hierro , constituido por fracciones de alto y bajo peso molecular , revela la degradación en condiciones de saturación , como determinante de un aumento de hierro , eventualmente transferido a plasma . Esto supone un aumento de la fracción de bajo peso molecular , con el consiguiente aumento en la concentración .

Forth y Rummel , 1.973 , atribuyen el papel en la regulación del metabolismo del hierro , interpretando el tamaño y/o la degradación , de pool en estado de saturación en célula mucosal ; refleja el status del hierro en equilibrio fisiológico animal .

Hegenauer et al. en 1.977 , Es difícil evaluar , las aplicaciones de Transferrina , así como la unión a ciertos tipos de células o la posible unión a sitios , no equivalentes a Transferrina .

Cavill et al. en 1.975 , sugieren un control de absorción del hierro , mediante un equilibrio , entre todos los pools existentes en el organismo .

Su hipótesis de equilibrio , conecta con absorción de hierro , tipo de turnover plasmático y el nivel de hierro almacenado en el organismo .

13. - MODELOS EN PLASMA DE CALCULO SIMILAR AL

----- HIERRO DE BAJO PESO MOLECULAR : -----

Algunos investigadores , rechazan los modelos matemáticos , en la interpretación de fenómenos biológicos , arguyendo la complejidad de la biología .

Se desarrollo un modelo , orientado en el descenso de complejos de bajo peso molecular , en sangre plasmática .

May et al. En 1.977 ; May y Willians en 1.977 ; Berthon et al. En 1.978 . Diseñaron un modelo relacionado con la cinética del hierro , cuantificando cambio de Hierro en distintos compartimientos del organismo .

El modelo de sangre plasmática , incluye el Fe(III) , en una serie de 7 iones metálicos considerados , remarcando sus concentraciones "in vivo" , identificando especies complejas predominantes . Aportando sugerencias de su participación en procesos fisiológicos , indicando la manipulación del hierro , de interés para su balance .

Transferrina aumenta , ante un limite de hierro plasmático , modificando la concentración acuosa de Fe(III) , se obtiene la aparente constante de disociación de Fe-Transferrina .

Aisen et al. midieron en 1.978 , la concentración de Fe(II) , calculada a partir de concentración de Fe(III) , utilizando el potencial Redox en plasma .

Los porcentajes son facilitados , respecto a la concentración total de ión metal , en ambos estados de oxidación , pues son independientes de los errores experimentales relativos al ión libre .

Bates et al.; Harries and Aisen , en 1.973 , postulan autooxidación de Fe(II) a Fe(III) por agentes complejantes .

Inversamente , en celulas con hierro de bajo peso molecular (donde el potencial redox , es más bajo que en plasma) exclusivamente en estado mas bajo de oxidación , asi Fe(III) puede ser reducido espontáneamente en citoplasma .

14. - DESIGNACION DE AGENTES QUELANTES PARA

TRATAMIENTO DE SOBRECARGA DE HIERRO :

El papel regulador , de elementos TRAZA , en algunos procesos Bioquimicos , incluye reacciones catalizadas por Metaloenzimas , alterando la utilización del ión metal "in vivo" .

Jackson et al. 1.978 . En casos de envenenamiento por toxicidad del metal , es manifiesto en quelatos antineoplásicos . Pudiendo ser conveniente , en general para todas las drogas , administrar el agente quelante ideal , resistente a la degradación metabólica .

El factor más importante , es la naturaleza multicompartimental de los sistemas fisiológicos . Realizandose el transporte por difusión pasiva .

Segun May and Williams , 1.979. Los requerimientos para la excreción urinaria del metal tóxico , están en función de su importancia :

- Suficiente lipófilo , para su penetración en membranas celulares , alcanzando los lugares de deposición del metal pesado .

- Complejo metálico lipofilico , en el compartimiento orgánico donde el metal se haya acumulado .

- Complejo hidrofílico en plasma, con el fin de establecer el gradiente de concentración necesario, siendo el metal eliminado en orina y no redistribuido en otros tejidos.

Abocando a TERAPIA SINERGICA DE QUELACION , mediante la utilización de dos drogas que actúen colectivamente sobre el metabolismo del metal, promoviendo su excreción . Esto sucede , cuando un agente moviliza en tejidos al metal , mientras los otros se unen en plasma para excreción urinaria .

15 .- METALOTIONEINA :

Los metales pesados, componentes minoritarios de la biosfera son :

Zinc, Cobre, Cadmio, Plata, Oro, Niquel y Cobalto.

Participan en gran variedad de reacciones enzimáticas el Cobre y Zinc , son nutrientes traza , para todas las formas de vida , resultando tóxicas en concentraciones inadecuadas.

La molécula con papel en el metabolismo metálico intracelular, descrita como pequeña , rica en cisteína , proteína metal ligando , conocida por Metalotioneina (Mt) .

Dicha fué descubierta , como proteína de Cadmio y Zinc en riñón de caballo (2,3) .

Metalotioneina liga a metales pesados , mediante agrupamientos de enlace tiólico .

Su síntesis está regulada homeostáticamente , en células y organismos expuestos a metales pesados.

La función de la Metalotioneina ha sido ampliamente debatido desde su descubrimiento , asignandosele papel en el metabolismo o detoxificación , sugerido por su habilidad a unir y ser inducida por metales pesados .

Otra posible función , aún no detectada , es el control de potencial Redox intracelular .

15.1- NOMENCLATURA :

Por desconocimiento de su función enzimática , Metalotioneinas , se han clasificado según su carácter estructural (4) .

Las características peculiares de Metalotioneina son :

- Alto contenido en metales pesados (típicamente 4-12 át./mol)
- Elevado contenido de cisteina (23-33 mol %)
- Bajo peso molecular (inferior a 10.000).

Los vertebrados , contienen 2 o más isoformas de Metalotioneina , agrupandose en dos clases denominadas : Mt-I y Mt-II , de acuerdo con su elución en DEAE-Celulosa .

15.2 .- ESTRUCTURA Y UNION A METALES PESADOS :

La estructura de la Metalotioneina , ha sido estudiada por gran variedad de técnicas Biofísicas y Bioquímicas incluyendo U.V. , Dicroísmo Circular , Espectroscopia Raman , Resonancia Magnética Nuclear , secuencia de Aminoácidos , Proteólisis parcial , así como Cristalografía de Rayos X .

Metalotioneina de mamíferos esta constituida por 61 ó 62 aminoácidos , conteniendo :

" 20 cisteinas "
" 6 - 8 lisinas "
" 7 - 10 serinas "
" 1 metionina "
" carencia de aminoácidos aromáticos e histidina ".

Los residuos de Cisteina presentes en Cys - X - Cys .
El contenido metalico de Metalotioneina , está en función del organismo , tejido , así como de su exposición a metales pesados .

Mt-II, aislada en hígado de ratas tratadas , contenian 5 átomos de Cd y 2 de Zn . (38) .

También en mamíferos la Mt , puede ligar 7 átomos de Co , Pb y Ni ó 10 - 12 átomos de Hg y Au . (41)

Por Resonancia Magnética Nuclear , se observo para la Mt , dos agrupamientos diferentes constituyendo :

Agrupamiento A :

- 11 cisteinas , uniendo 4 átomos de Zn o Cd , ó 5 - 6 átomos de Cu , en el alfa carboxi terminal , entre los aminoácidos 31 a 61 .

Agrupamiento B :

- 9 cisteinas , unidas por 4 átomos de Zn o Cd , o 6 átomos de Cu , en disposición beta amino terminal , entre los aminoácidos 1 a 30 .

Los iones metálicos estan coordinados tetraedricamente , con 4 ligandos tiolicos de cisteina .

El agrupamiento A contiene 4 átomos de Cd unidos por dos puentes sulfuro terminal . El cuarto átomo de Cd en disposición tetraedro distorsionado , o mariposa inserto en dos anillos de 6 átomos .

El agrupamiento B contiene 2 átomos de Zn y 1 de Cd , unidos por dos puentes sulfuro terminal , los iones metal

forman un triángulo equilátero en un anillo de 6 átomos ,
adoptando configuración de silla .

Las distancias metal - metal en ambos agrupamientos ascienden
a un rango de 3,9 a 5,2 Amstrom .

Furey et al . Manifestaron que los citados dominios , son
globulares con diámetros de 15 a 20 Amstrom , limitados de 30
a 31 residuos elipsoides .

La proteína patrón en los dominios alfa y beta ,
topológicamente es similar .

Su cadena polipeptídica da 3 vueltas en espiral alrededor de
los átomos metálicos .

15.3 - POSIBLES FUNCIONES EN EUCARIOTES :

Metalotioneína fué descubierta en función de su habilidad
para unirse a Cd , elemento no esencial y elevadamente tóxico .

De aquí su posible implicación en detoxificación de este ión
Posteriores descubrimientos , sugieren Mt es inducida por Zn
y Cu a distintas concentraciones , durante el desarrollo y en
situación de stress , conduciendo a incrementar el interés de su
posible implicación , en el metabolismo de metales esenciales .

15.4 - EXISTENCIA DE LUGARES DE UNIÓN A HIERRO :

Mediante estudios Espectroscópicos y Químicos de estas
proteínas , se ha establecido la presencia de 2 lugares de
unión Metal - Azufre con 3 y 4 iones metálicos , respectivamente
(102 , 154) , donde cada ión metálico , se encuentra coordinado
tetraédricamente con 4 ligandos tiólicicos (145 , 146) .

Partiendo de la detección de hierro como constituyente
minoritario , de Metalotioneína Renal Equina (71) , se ha
considerado la posible intervención de dicha proteína , en el
metabolismo intracelular del hierro . No obstante , a consecuencia
de sus propiedades "in vitro" , respecto a la unión de Fe(II) a Mt
libre de metales (ApoMt) aún en estudio (76) .

En condiciones adecuadas , se mostró en hígado de conejo Mt-1 (48) , iones paramagnéticos de Fe(II) pudiendo originar complejos , similares a los formados en condiciones normales , con iones diamagnéticos Cd (II) o Zn (II) .

La unión de iones Fe(II) a ApoMt , fué caracterizado por las técnicas de Absorción Electrónica y Dicroísmo Circular .

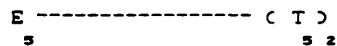
15.5 - ABSORCION ELECTRONICA :

Siete equivalentes de Fe(II) unidos , incrementan la absorbancia en el Ultra Violeta e Infra Rojo cercano ; los niveles orientan sobre la forma saturada de Fe(II)₇ - Mt .

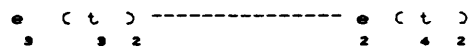
Su coordinación es tetraédrica , similar a Co(II) . (146)

En la región de Infra Rojo cercano , se obtienen resultados semejantes , para compuestos inorgánicos mononucleares (59 , 81 , 23 , 50) , modelos péptidicos (140bis)

La absorción en el campo de ligandos referente a Fe(II)-Mt es atribuido a la transición :



En el campo tetraédrico correspondiente a la transición electrónica :



15.6 - DICROISMO MAGNETICO CIRCULAR :

Se observaron perfiles similares , a los correspondientes complejos mononucleares tetraédricos , tetratiolato-Fe en Rubredoxinas y Desulforedoxina , correspondientes a las especies D gigas y C. pasterianum . (31 , 67)

Dichos resultados (73) , así como , los estudios con Zn (II) , Co (II) y Cd (II) aplicados a la metalotioneina , comprueban la repercusión de esta proteína , respecto del sitio de unión a metales , en la disposición de la misma . (146)

15.7 - BIOSINTESIS DE LA METALOTIONEINA Y SU REGULACION :

Karin et al. en 1.984 (73) asignaron la región del promotor de Mt- 2A humana hacia el nucleótido 250 , uniéndose al receptor de Glucocorticoides , requisito necesario para la regulación del gen mediante el glucocorticoide Dexametasona .

La regulación transcripcional de Mt-2A humana por el interferon alfa , posiblemente se verifica por la secuencia analoga a los correspondientes locus antigénicos HLA-A3 y HLA-DR . histocompatibles regulado por el interferón. (45)

Actualmente (125) se propone un modelo explicativo de regulación de promotores de Metalotioneina a través de metales pesados .

Se obtiene la máxima biosíntesis , entre las 4 y 10 horas de la administración de iones metálicos Zn o Cd (131 , 114 , 19 , 128 , 132 , 80, 4 , 139)

Así como , el aumento de concentración de Metalotioneina , en función de la dosis del metal administrado . (106 , 108 , 114 , 120)

Brady en 1.982 (14) sugiere la inducción de Metalotioneina , a partir de hormonas o metales como sigue :

- Exposición de la célula a glucocorticoides o metales
- Inducción de síntesis de RNAm de Tioneina, en 4 horas, resultando sensible para Actinomicina
- Estimulos de síntesis de Metalotioneina, observables de 2 a 4 horas
- Elevado nivel acumulado de Metalotioneina de 18 a 24 horas
- Una vez separado el inductor , disminuyen los niveles de Tioneina .
- Se alcanzan niveles basales , de 48 a 72 horas .

15.8 - DEGRADACION Y EXCRECION DE METALOTIONEINA :

Brady et al. 1.979 (15) obtuvieron una vida media para Zn-Mt de 10 horas , inducidas por Sulfato de Zinc .

Por otra parte , Andersen et al. (4) , disponen de 20 a 30 horas para el turnover de S 35-Cisteina , asi como un turnover de 4 a 5 horas para Hg 203 , unido "IN VIVO" a Zn-Mt .

Estas diferencias son debidas , parcialmente , a la utilización de distintos modelos experimentales , posiblemente la vida media de esta Mt puede variar , en función del contenido metálico (relación Cd / Zn) (98)

La vida media de Cu-Mt , por administración Intravenosa , suele ser de minutos (16) , en cambio el Cu unido a Albumina , supera 10 minutos , la Ceruloplasmina , suele ser de 13 horas (90)

El flujo de Cobre , donde la Metalotioneina podria tener elevada significación biológica, comprobándose la vida media de la proteína endógena en plasma, resulta igualmente baja a la Cu-Mt administrada por via parenteral.

En ratas con sobrecarga de Cobre , la excreción biliar de Mt-1 aumenta , en relación al contenido de Mt-1 hepático . Pero el rango de excreción suele ser de 0.4 microgramos de Mt-1 / h , después de 4 semanas . Equivalente al 1-2 % del turnover de Isopresina hepática. Según comprobación en ratas previamente inyectadas con sales de cobre , (122) presentandose componentes Inmunoreactivos en bilis .

En ratas saturadas de cobre , se obtuvieron concentraciones elevadas de Mt-1 en orina . Poniendo de manifiesto , los productos degradados de Mt-1 , son excretados por orina . (16)

Chang et al. (20) pusieron de manifiesto la existencia de fragmentos de Metalotioneina , en la orina de ratas expuestas a Cd , puesto que la Metalotioneina se resiste a la hidrólisis , "IN VITRO", con enzimas lisosomales. (91)

Estudios llevados a cabo con Cisteina marcada con S-35 , manifestó la inducción de Metalotioneina con Zn, Au y Cd , obteniendose las respectivas vidas medias de : 10, 0.75 y 24 horas Tales diferencias , son debidas a la estructura terciaria del complejo metal-Metalotioneina. (93)

Lauwerys señala , un aumento de Metalotioneina urinaria , en aquellos trabajadores que se encuentran expuestos a Cd , careciendo de relación con el daño renal ocasionado .

La Metalotioneina se considera indicador Bioquímico , a nivel dosificador , aunque se desconoce su utilización . (82)

III. MATERIAL Y METODOS :

1. INDUCCION DE ANEMIA FERROPENICA EN RATAS

1.1 - Animales :

Se utilizarón 30 ratas macho , de raza SRAGUE-DAWER , con un peso aproximado de 250 ± 10 gramos. Repartidas en dos grupos .
Uno Control constituido por 10 animales y el grupo de estudio , compuesto por 20 ratas.

1.2 - alimentación :

El grupo Control se alimentó con piensos Standard , cuyo contenido en Hierro fué de 140 mg / Kg y administración de agua " Ad Libitum "

El grupo de animales destinados a provocarles Anemia Ferropénica , se les alimentó con una dieta deficiente en Hierro , preparada en nuestro laboratorio, según se reseña a continuación .

1.3 - PREPARACION Y COMPOSICION DE LA DIETA DEFICIENTE EN

HIERRO

Componentes :

Almidón ----- 1.000 g.
Sacarosa----- 251 g.
Celulosa----- 300 g.
Aceite de Oliva---- 234.37 g.
Mezcla Vitaminica-- 47 g.
Mezcla Mineral----- 234.37 g
Caseina ----- 459.37 g.
Metionina ----- 9.37 g.

Mezcla Mineral :

Cloruro Sódico ---- 32.64 g.
Yoduro Potásico --- 0.18 g.
Fosfato Monopotásico 91.17 g.
Sulfato Magnésico Anhidro 13.42 g.
Carbonato Calcico -- 89.39 g.
Sulfato Manganico hidratado - 0.93 g.
Sulfato de Zinc Hepta Hidratado 0.12 g.
Sulfato de Cobre Penta Hidratado 0.11 g.
Cloruro de Cobalto Sexta Hidratado 0.53 g.

Mezcla Vitaminica :

Vitamina A -----	32.225 mg.
Vitamina D -----	16 mg.
Vitamina E -----	46.87 mg.
Menadiona -----	23.43 mg.
Colina -----	74 mg.
P-Amino Benzoico ----	47 mg.
Inositol -----	47 mg.
Niacina -----	10.6 mg.
Pantotenato Calcico -	10.6 mg.
Riboflavina -----	37.5 mg.
Tiamina Clorhidrica -	2.34 mg.
Piridoxina Clorhidrica	23.4 mg.
Ac. Fólico -----	9.37 mg.
Biotina -----	1.87 mg.
Vitamina B 12 -----	0.14 mg.

Los citados componentes finamente pulverizados, se homogenizaron con un mezclador mecánico, depositandose en jaulas metabólicas y agua destilada "Ad Libitum".

1.4 - Extracciones :

Dichas ratas fueron sometidas a extracciones de 4 c.c. de sangre, en consonancia con la evolución del estado anémico.

Se llevarón a cabo , anestesiando a los animales , ayudados de Eter Etilico , mediante "Punción Cardiaca". Determinandose de este modo , los parametros Bioquimicos encaminados a supervisar el estado anémico

1.5 - ESTANDARIZACION DEL TRANSTORNO ANEMICO :

La determinación de parámetros Bioquimicos , para supervisar el estado anémico , mediante extracciones de sangre , se verificó atendiendo a los grupos control e inductor de anemia hipocrómica ; concretandose en las siguientes determinaciones :

1.5.1 - Hematocrito :

En sangre total , de acuerdo con la técnica de WINTROBE (155).
Para ello utilizamos el micrométodo de Wintrobe (155)
La muestra problema , consistió en sangre total, dispuesta en tubos capilares heparinizados previamente , de 7 cm. de longitud y 1mm de diametro . Sometiendose a centrifugación de 11.000 r.p.m. por espacio de 8 minutos .
Siendo el modelo de centrifuga utilizado Sigma 101 M , provisto de rotor especifico para tubos de Hematocrito . Determinandose acto seguido , la relación entre el volumen de eritrocito y sangre total .

1.5.2 - Hemoglobina :

En sangre total, según la técnica de VAN KAMPER y ZIJLSTRU. (351)

1.5.2.1.- Fundamento :

Diluyendo la sangre en disolución de Cianuro y Ferricianuro Potásico , la Hemoglobina sufre oxidación transformandose en Metahemoglobina , transformandose a su vez en " Cianmetahemoglobina " estable .
La formación de color se determina Espectrofotometricamente , mediante el Espectrofotómetro U.V.- Visible modelo " Unicam SP 1.800 "

La muestra problema , consistio , en sangre total heparinizada .

1.5.2.2- Reactivo de Trabajo :

Solución " Drakin " diluida , preparada como sigue :

- . Bicarbonato Sódico : 1 g.
- . Ferricianuro Potasico : 200 mg.
- . Cianuro Potasico : 50 mg.
- . Agua Destilada : 1.000 ml.

La disolución se coloca en frasco , color topacio conservandose en la oscuridad , permaneciendo estable por un periodo de 1 mes .

1.5.2.3. - TECNICA :

En una serie de tubos de ensayo , se pipetea los componentes siguientes :

	Blanco -----	Problema -----	Control -----
Disolución Drakin diluida	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml
Sangre Heparinizada		0.02 ml	
Disolución Control de Hemoglobina			0.02 ml

Se mezclan los tubos de ensayo por inversión , obteniendose la lectura de la correspondiente Densidad Optica , a partir de 3 minutos , a una longitud de onda de 540 nm.
Una vez ajustado el aparato a cero con el Blanco .

Los calculos para los tubos problemas , se efectuan de acuerdo con la relación :

$$\frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. control}} \times 75 \text{ g. Hb} / 100 \text{ ml} = 100 \text{ ml del problema}$$

Esta relación permanece lineal, hasta 20 g Hb / 100 ml

1.5.3 - DETERMINACION DE HIERRO EN SUERO :

Según la Técnica de LAUBER (80)

1.5.3.1.- Fundamento :

El Hierro transportado por la Transferrina Sérica ,se disocia en medio ligeramente ácido , reduciéndose con Ditionito .

El catión Fe (II) en presencia de Batrofenantrolina disulfonada , origina un complejo coloreado , de intensidad proporcional a la concentración de hierro presente en la muestra de ensayo .

1.5.3.2.- Técnica :

La determinación se verifica en Suero heparinizado exento de hemolisis .

En tubos de ensayo se pipetea como sigue :

	Blanco	Problema	Control
	-----	-----	-----
Agua	0.5 ml		
Suero Problema		0.5 ml	
Disolución Control de hierro			
100 ug / 100 ml			0.5 ml
Disolución Reductora	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml

Se mezclan los tubos por inversión . Con el tubo blanco se ajusta a cero , en el Espectrofotómetro U.V.-Visible , modelo "Unicam SP 1.800", procediendo a efectuar las lecturas de las correspondientes Densidades Ópticas , de los respectivos tubos Control y Problema a la longitud de onda de 530 nm. (D.O.)

Acto seguido , se añade en cada tubo 2 gotas de Batrofenantrolina Disulfonada (17 mM) . Volvemos a mezclar los tubos, procediendo a determinar las Absorbancias de los tubos Control y Problema ; a la longitud de onda anteriormente citada , previo reajuste a cero del aparato con el blanco .

Considerando la permanencia estable de color , por espacio de 60 minutos . (D.O.2)

Los calculos se verifican atendiendo a la siguiente relación :

$$\frac{(D.O.2 - D.O.1)}{(D.O.2 - D.O.1)} \times 100 \text{ ug} / 100 \text{ ml} = \text{ug} / 100 \text{ ml}$$

del problema

La expresión de los resultados en $\mu\text{mol} / \text{l.}$ se multiplica los $\text{ug} / 100 \text{ ml}$ por el factor de conversión 0.179

El material dedicado a dicha determinación , ha de estar exento de hierro , para ello se sumerge en Cl H diluido (20 % V / V) por espacio de 6 horas , a continuación debe enjuagarse con repetidos cambios de agua destilada .

Los Sueros lipémicos , inicialmente proporcionan falsamente , elevadas extinciones , por ello se recomienda esperar unos 15 minutos , con el fin de facilitar la acción detergente de la disolución reductora , antes de continuar el protocolo .

Los sueros hemolizados , pueden liberar hierro del complejo hemoglobínico .

1.5.4. - DETERMINACION DE LA CAPACIDAD TOTAL Y

LIBRE DE FIJACION DE FIJACION DE HIERRO

EN SUERO :

Según la técnica de LAUBER (80)

1.5.4.1. - Fundamento :

La Transferrina Sérica , se satura con Fe (III) , el exceso precipita con Carbonato Magnésico , procediendo acto seguido , a determinar la cantidad existente de Hierro.

La diferencia entre la capacidad de Fijación Total de Hierro (CFT) y el Hierro Sérico Inicial (HS) , indica la capacidad de Fijación Libre o Residual (CFL)

1.5.4.2. - Técnica :

La muestra problema , constituida por Suero Heparinizado, exento de Hemolisis .

El reactivo reductor , consiste en disolución de Ditionito Sódico al 40 % en tampón Acetato 130 mM , pH = 5.8. Dicha es estable 8 horas a temperatura ambiente , en nevera permanece inalterable durante 5 días.

Procedemos como sigue :

En tubos de ensayo ponemos :

	Blanco	Problema
	-----	-----
Agua destilada	0.5 ml	
Suero		0.5 ml
Cloruro Férrico		
93 μ M	1.0 ml	1.0 ml

Se mezclan los tubos , permaneciendo en reposo durante 5 minutos , a temperatura ambiente . Acto seguido adicionamos , en cada tubo 50 mg de carbonato magnésico , agitando la mezcla 5 minutos , por espacio de 30 minutos . Centrifugando a alta velocidad , separando el sobrenadante .

A continuación en tubos de ensayo :

	Blanco	Problema	Control
	-----	-----	-----
Sobrenadante	0.5 ml	0.5 ml	
Control de Hierro			0.5 ml
Disolución Reductora	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml

Una vez mezclados , se pone a cero el aparato con el tubo Blanco , procediendo a realizar las lecturas de las extinciones , correspondientes a los tubos Control y Problema a 530 nm de longitud de onda (D.O.)

A continuación , añadimos en cada tubo 3 gotas de Batrofenantrolina Disulfonada 17 mM . Mezclamos , determinamos las Densidades Ópticas , de los tubos Control y Problema , a la longitud de onda , anteriormente indicada , previo ajuste a cero con el blanco .

El color permanece inalterable , unos 60 minutos . Las lecturas de las correspondientes , Densidades Ópticas , se verifican en un Espectrofotómetro " U.V.-Visible " modelo " Unicam SP 1.800 " .

Los calculos se realizan , de acuerdo con la siguiente relación :

C.F.T. :

$$\frac{(D.O.2 - D.O.1) \text{ problema}}{(D.O.2 - D.O.1) \text{ control}} \times 300 = \text{ug Fe} / 100 \text{ ml}$$

C.F.L. : C.F.T. - H.S.

C.F.T. = Capacidad total de fijación de hierro en suero

C.F.L. = Capacidad libre de fijación de hierro en suero

H.S. = Hierro en suero

Para transformar los $\mu\text{g Fe} / 100 \text{ ml}$ en $\mu\text{mol} / \text{l}$, los resultados obtenidos , se multiplican por el factor de conversión 0.1

2.- CONTROL DEL CRECIMIENTO , DIETA Y AGUA DE

----- BEBIDA DE LOS ANIMALES ANEMICOS Y CONTROL -----

La distribución de los animales fué , en grupos de pesos homogéneos . El periodo de inducción de anémia se prolongo durante 26 días , controlandose el peso , agua de bebida y dieta ingerida , en ambos grupos , es decir , en los animales control y en los sometidos al proceso de inducción del estado de anemia ferropénica .

En el inicio del experimento , los grupos en estudio , presentaban un peso medio homogéneo , sin diferencias estadísticamente significativas .

3. - ELECCION DE LA DOSIS OPTIMA DE CADMIO PARA

INDUCCION DE METALOTIONEINA EN CEREBRO , MUCOSA

INTESTINAL Y MEDULA OSEA :

3.1 - GRUPO DE ANIMALES Y VIAS DE ADMINISTRACION :

Grupos de ratas macho de raza SPRAGUE-DAWER constituidos por 20 ejemplares de 250 ± 10 g de peso , controles y 20 ratas con anemia ferropénica , se les administró dosis de Cd , procedente de una solución estable de Cloruro de Cadmio , según se refleja en la tabla :

DOSIS DE TRATAMIENTO : 1 2 3 4 5 6

GRUPO CONTROL :

"	"	*	*				
"	"	*	*	*			
"	"	*	*	*	*		
"	"	*	*	*	*	*	
"	"	*	*	*	*	*	*

GRUPO ANEMICO :

"	"	*	*						
"	"	*	*	*					
"	"	*	*	*	*				
"	"	*	*	*	*	*			
"	"	*	*	*	*	*	*		*

* = dosis de 1 mg Cd / kg rata / día

La administración de los citados metales , se llevo a cabo por via via Intragastrica , mediante sonda , partiendo de una disolución de 1 mg de Cd / ml

Culminados los distintos tratamientos , se procedio al sacrificio de los animales , obteniendose por disección el Cerebro Mucosa Intestinal y Médula Osea . Se lavarón con solución fisiológica al 0.9 % , la homogenización se realizó con tampón Tris-ClH 25 mM , pH = 7.4 (1:2 , P:V) mediante "Ultra Turrax" modelo TP-18-10

Los distintos homogenados fuerón sometidos a ultracentrifugación de 40.000 r.p.m. por espacio de 60 minutos , modelo "Centrikon T-2080".

Una vez recogidos los sobrenadantes , se procedio a las siguientes determinaciones :

3.2- DETERMINACIONES :

- .Determinación de Proteínas Totales por el método de LOWRY modificado por HARTREE (56)
- .Determinaciones de Cd por Espectroscopia de Absorción Atómica , utilizando Espectrofotómetro "Beckman 1248" en extractos estables.
- .Determinación de grupos disulfuro siguiendo el método descrito por ZAHLER y CLELAND (161)
- .Determinación de Metalotioneina por la técnica espectrofotométrica de Absorción Atómica . (101)

3.2.1.DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES

3.2.1.1.- METODO DE LOWRY MODIFICADO POR HARTREE

3.2.1.2- Fundamento :

Las proteínas tratadas con el reactivo fenol , denominado "Folin - Ciocalteau " se desarrolla color azul . La sensibilidad del método estriba en que las dos reacciones de color , se producen simultáneamente :

a) La de los enlaces peptídicos con el cobre en solución alcalina .

b) Reducción del ácido fosfomolibdico y ácido fosfo-túngstico , por los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano , presentes en las proteínas .

3.2.1.3. Técnica :

Se prepara la disolución A con los siguientes componentes .
(para 100 ml. de disolución) :

$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{C}_4 \text{H}_4 \text{K Na O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.10 g
$\text{CO}_3 \text{Na}_2$	3.70 g
Na OH	2.00 g

En principio se disuelve el sulfato de cobre en agua , acto seguido se añaden los restantes componentes citados .
La disolución permanece estable 30 días en nevera .

En tubos de ensayo , se pipetea lo siguiente :

	Blanco	Problema	Control
	-----	-----	-----
Disolución A	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Albúmina patrón (curva patrón a distintas concentraciones)			20 μ l
Suero problema		20 μ l	
Agua destilada	100 μ l	100 μ l	100 μ l

Se agitan los tubos y se dejan en reposo 10 minutos a temperatura ambiente .

Acto seguido , se añade a cada tubo 2 ml del reactivo de fenol , preparado extemporaneamente :

0.5 ml Folin-Ciocalteu 2N -----> 8,5 ml agua destilada

Se mezclan y se llevan a baño maria a 55°C durante 5 minutos . Se dejan enfriar los tubos , se determinan sus densidades ópticas en Espectrofotómetro UV - Visible " Unicam SP 1.800 " , ajustando previamente a cero , el aparato con el tubo blanco .

Las concentraciones protéicas de los tubos problema , se determinaron por extrapolación , en la curva patrón con distintas concentraciones de albúmina .

3.2 .2 - DETERMINACION DE CADMIO POR ESPECTROSCOPIA DE

----- ABSORCION ATOMICA : -----

Se utilizó el espectrofotómetro de Absorción Atómica modelo "Beckman 1248" de lectura analógica . Se procuraron unas condiciones instrumentales adecuadas , para la obtención de la máxima Absorbancia y Sensibilidad.

La lámpara utilizada fué de catodo hueco de Cd , como fuente emisora de radiaciones de longitud de onda determinada.

La lectura se verificó a la longitud de onda de mayor Absorbancia y nivel energético , en función del espectro característico del metal a determinar , en el caso del Cd es de 228.8 nm.

Tiempo de lectura (4 a 8 segundos)

Rendija (5)

Corriente (7 mA)

Voltaje (500-600 V)

La energía de la lámpara permanecio constante , en las lecturas de las " Soluciones Standard ".

Así como en las muestras problemas , desde el inicio de la lectura de las muestras hasta el final.

En la elaboración de la curva de calibración , se preparó una batería de disoluciones de Cd standard , de concentraciones que se detallan a continuación :

0.1 ; 0.3 ; 0.5 ; 0.7 ; 0.9 ; 1 ; 3 ; 5 ; 7 ; 9 ; 10 ppm de Cd

La lectura se verificó , cada 10 muestras problema .

Obteniendose, de este modo la curva de calibración , correspondientes a las distintas muestras , representando en el eje de abscisas las Concentraciones y en el de Ordenadas las Absorbancias.

De acuerdo con estos resultados , se calculó la correspondiente recta de Regresión , así como el Coeficiente de Correlación , oscilando entre 0.9990-0.9999

Las correspondientes concentraciones de las muestras problema , fueron calculadas a partir de la curva de calibración

3.2.2.1 - DETERMINACION DE HIERRO POR ESPECTROSCOPIA DE

----- ABSORCION ATOMICA : -----

La lámpara utilizada fué de catodo hueco de Fe , la lectura se verificó a la longitud de onda de mayor Absorbancia y nivel energético , siendo de 248.33 nm

Tiempo de lectura	(15 segundos)
Rendija	(3)
Corriente	(20 mA)

Se prepararon soluciones standard de concentración conocida , con el objeto de elaborar la curva de Calibración .

Siendo las citadas :

0.1 ; 0.3 ; 0.5 ; 0.7 ; 0.9 ; 1 ; 3 ; 5 ; 7 ; 9 y 10
ppm de Fe

Las concentraciones de las muestras problema , se realizaron a partir de la curva de calibración , una vez obtenido el coeficiente de correlación , de la recta de regresión .

En todos los caso fué de 0.9960 y 0.9999

3.2.2.2 - DETERMINACION DE ZINC POR ESPECTROSCOPIA DE

----- ABSORCION ATOMICA : -----

Se utilizó lámpara de catodo hueco de Zn , la longitud de onda de mayor Absorbancia y nivel energético , fué de 324.75 nm

Tiempo de lectura	(8 segundos)
Rendija	(5)
Corriente	(20 mA)

Las soluciones standard de concentración conocida , para elaborar la curva de calibración , fuerón :

0.1 ; 0.3 ; 0.5 ; 0.7 ; 0.9 ; 1 ; 3 ; 5 ; 7 ; 9 y 10
ppm de Zn

Las concentraciones referentes de las muestras problema se calcularón , mediante la curva de calibración , del citado elemento .

El coeficiente de correlación de la recta de regresión fué de 0.9960 y 0.9999

3.2.2.3. -DETERMINACION DE COBRE POR ESPECTROSCOPIA DE

----- ABSORCION ATOMICA : -----

Procediendo de igual modo que para el Cd y Zn , se utilizó una lámpara de catodo hueco de Cu , verificandose la lectura en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica , modelo BECKMAN 1248 de lectura analógica .

En este caso las condiciones de lectura fuerón :

- Longitud de onda de máximo nivel energético y absorbancia:
324,75

Tiempo de lectura.....(8 segundos)
Rendija.....(5)
Corriente.....(20 mA)

Se prepararon una bateria de disoluciones standard de
concentración conocida :

0.1 ; 0.3 ; 0.5 ; 0.7 ; 0.9 ; 1 ; 3 ; 5 ; 7 ; 9 y 10
ppm de Cu

Con los cuales se realizó la curva de calibración

3.2.3.- Determinación de la Metalotioneina por

Espectrofotometria de Absorción Atomica :

3.2.3.1.- Fundamento :

Basado en el método de saturación con Cd de ONOSAKA (101)
La ventaja del método reside , en la unión cuantitativa del Cd a
la Metalotioneina , la estabilidad de la citada frente al
calor , así como su radio molar definido en 7 moles de Cd por mol
de Metalotioneina. (154)

3.2.3.2. - Técnica :

Dilución de las muestras con tampón Tris-ClH 25 mM
pH = 7.4 ; incubados por espacio de 5 minutos con Cloruro de
Cadmio . (1.000 ng de Cd)

El Cadmio no unido a Metalotioneina , precipitó con la
Hemoglobina (en disolución al 4 %) ; acto seguido se someten las
muestras a 100 grados C. por espacio de 3 minutos , a continuación
centrifugación a 9.200 r.p.m. ; procediendo a recoger los
sobrenadantes .

La última fase del proceso , (precipitación con
Hemoglobina , calor y centrifugación) verificandose por 3 veces
consecutivas .

En los sobrenadantes se determina por espectrofotometria de
Absorción Atómica.

La corrección de los resultados , se lleva a cabo
utilizando un blanco experimental , considerando la hemoglobina
no precipitado .

La conversión de precipitado de Cd a microgramos de
Metalotioneina , se verifica considerando que esta proteína
dispone de 7 átomos de Cd por moléculas saturadas , en dos
fragmentos , uno conteniendo 4 iones metálicos de Cd con 6 puentes
tiolicos , unidos a 11 restos de Cisteina , constituyendo el
Carboxilo terminal de la molécula .

El otro contiene 3 iones metálicos de Cd unidos por 3
puentes tiolicos a 9 restos de Cisteina , originando la otra mitad
de la molécula .

3.2.4. - Determinación de Radiactividad Gamma :

En los extractos sometidos a tratamiento radiactivo , se determinó la radiactividad gamma debida al Fe - 59 , mediante un contador de radiactividad modelo " PACKARD Autogamma 5110 "

4.-PURIFICACION DE LA METALOTIONEINA EN CEREBRO ,

MUCOSA INTESTINAL Y MEDULA OSEA EN RATAS SOMETIDAS A

DISTINTOS TRATAMIENTOS :

El objetivo propuesto , consiste en lograr la extracción y purificación de la Metalotioneina , eficazmente y de modo rentable , obteniendo un extracto purificado.

Dadas las circunstancias de termoestabilidad de esta proteína , se comprobó la exención en cuanto a propiedades de carga , tamaño molecular y conformación estructural , según los metodos de gel filtración , espectroscopia U.V. ; comprobando su polimorfismo .

Basado en su distinto comportamiento , en electroforesis multifasica en gel de poliacriamida .

El proceso de aislamiento y purificación de la Metalotioneina se verificó , como se reseña a continuación.

4.1 - Grupos de Animales y Tratamiento :

Se utilizaron grupos de ratas macho de raza SPRAGUE-DAWER constituidos por 20 ejemplares , siendo sus pesos de 200 ± 10 , distribuyendose como sigue :

- A) Grupo de animales Control
- B) Grupo de animales sometidos a la administración de 1 mg Cd / kg rata / dia , durante un espacio de 6 dias consecutivos por sonda intragastrica a partir de una solución de Cloruro de Cadmio
- C) Grupo de animales con Anemia ferropénica
- D) Grupo de animales con Anemia Ferropénica a los cuales , se administró 1 mg Cd / kg rata / dia durante 6 dias . mediante sonda intragastrica a partir de una solución estable de Cloruro de Cadmio .

4.2 -Obtencion del Extracto Celular :

Una vez finalizados los distintos tratamientos , se procedió al sacrificio de los animales , por dias consecutivos .

Después se procedio a la disección del CEREBRO , MUCOSA INTESTINAL y MEDULA OSEA .

Se pesaron los órganos en fresco , congelandoles rápidamente a -20 grados C.

La homogenización se realizó , descongelando los distintos órganos , pesandolos y se sometieron a la acción del "ULTRA-TURRAX modelo " TP-18-10 " , a 2.000 r.p.m. con tampón Tris-ClH 25 mM pH = 7.4 , obteniendose un extracto del 20 % P / V

Acto seguido se centrifuga a 40.000 r.p.m. por espacio de 60 minutos , en ultracentrifuga " Centrikon T-2080.

Los sobrenadantes se sometieron a ultrasonidos en dos periodos sucesivos de 30 segundos , en modelo " MSE 1765 "

5.- FILTRACION MOLECULAR EN COLUMNA DE SEPHADEX G - 50

EN CAMARA FRIGORIFICA A 4 GRADOS C ;

A traves de Sephadex G-50 "Fine" de Pharmacia Fine Chemicals (Upsala , Suecia) columna de radio interior de 2.5 cm. y altura de 70 cm.

Las fracciones eluidas fuerón recogidas mediante un equipo de LKB constituido por lo siguiente :

- * Detector de Absorción Ultravioleta con unidad control y filtro de 250 nm (Uvicord-2)
- * Registrador Type 6520 / 4
- * Colector de fracciones UltraRac.
- * Bomba peristaltica 4912 A

La calibración de la columna se verificó , con moléculas de relativa masa molecular conocida , englobando a las estudiadas :

- Beta-lactoglobulina (Mr = 18.400)
- Lisozima (Mr = 14.300)
- Ribonucleasa (Mr = 13.700)
- Citocromo C (Mr = 12.400)
- Triptofano (Mr = 204)

Determinando el volumen de máxima permeabilidad de la columna (Vt)

Para la obtención de Vo (Volumen de vacío de la columna) se utilizó una proteína de Mr superior al correspondiente rango de separación del Sephadex G - 50 (1.500 - 30.000) como la Transferrina .

Se calcularon los kr (coeficientes de reparto) de las proteínas utilizadas en la calibración , en consonancia con la fórmula :

$$K_r = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Donde Representa :

Ve : Volumen de elución de cada proteína

Los diferentes extractos , se depositaron en la parte superior de la columna , eluyendo con el mismo tampón utilizado en la obtención de los extractos :

Tris-ClH 25mM pH = 7.4

La columna se reguló con flujo de 40 ml / h ,
recogiendose fracciones de 6.5 ml.

La cantidad de extracto depositado , en la columna , fue correspondiente a igual peso de : Cerebro , Mucosa Intestinal y Médula Osea .De ratas sometidas a los diferentes tratamientos , reseñados anteriormente.

Las fracciones recogidas se leyeron en un Espectrofotómetro U.V.-Visible , modelo " Unicam SP 1.800 " a 254 y 262 nm (la primera longitud de onda , es considerada de máxima Absorción para la Metalotioneina)

Se verificarón determinaciones de :

5.1.- DETERMINACIONES :

5.1.1- Determinación de Proteínas Totales , por el método de LOWRY modificado por HARTREE (58)
(Descrito en el apartado 3.2.1)

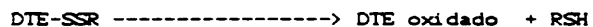
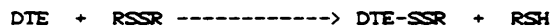
5.1.2- Determinación de Zn , Cd y Fe , en los extractos procedentes de animales sometidos a tratamiento con dichos elementos , por Espectrofotometria de Absorción Atomica . (Expuesto en el apartado 3.2.2.2 , 3.2.2 , 3.2.2.1.)

5.1.3.-Determinación de Grupos disulfuro , según la técnica descrita por ZAHLER y CLELAND (154)

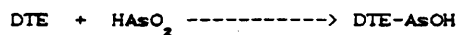
5.1.3.1- Fundamento :

Esta técnica , esta basada en la reducción de los grupos disulfuro y en la determinación de los monotioles resultantes .

El agente reductor es el 1,4-Ditioeritritol (DTE) , de bajo potencial de oxidación-reducción , reduce los grupos disulfuro en consonancia con las reacciones siguientes :



Con el fin de eliminar los grupos sulfhidrilo producidos por exceso de DTE , se añade arsenito sódico que forma complejo especifico con el anterior , de acuerdo con la reacción :



Los monotioles resultantes se determinan con DTNB (5,5 - ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) en presencia de arsenito .

Los grupos disulfuro son reducidos por DTE (1,4 -ditioeritritol) y por el DTT (1,4 -ditiotreitol) , como indican sus iguales potenciales de oxidación - reducción , sin embargo , el DTE es el reactivo de elección , porque sus complejos con arsenito reaccionan en menor proporción con el DTNB .

5.1.3.2.- Técnica :

De la muestra problema que contiene los grupos disulfuro , se cogen 0.2 ml y se mezclan con 0.1 ml de tampón Tris- ClH 0.05 M pH 9.0 y con 0.1 ml de DTE 3 mM . Después de mezclarlo todo se deja en reposo 20 minutos , para que se produzca la reducción de los grupos disulfuro , este tiempo era el adecuado para la mayor parte de los compuestos con grupos disulfuro . (181) . Una vez completada la reacción se adicionan 0.2 ml de tampón Tris - ClH 1 M , pH 8.1 ; 1.5 ml de Na As O₂ 5 mM y agua destilada hasta completar el volumen final de 2.9 ml . Una vez mezcladas las disoluciones se dejan reposar durante 2 minutos . Acto seguido se añaden 0.1 ml de DTNB 3 mM de tampón acetato 0.05 M , pH 5 , determinandose las Absorbancias a 412 nm durante 3 minutos . La absorbancia resultante de los monotioles se determina por extrapolación de la porción lineal de la curva al tiempo de adición del DTNB , restando el valor obtenido de una muestra que no contenga disulfuros .

Como referencia se utilizó una curva patrón de cisteína de concentraciones conocidas , a la cual se refirieron las muestras problema .

Los datos obtenidos como cantidades de cisteína presente en la muestra problema , se tradujeron a niveles de metalotioneína teniendo en cuenta que esta proteína presenta en su composición un 33 % de residuos de cisteína .

5.1.4.- Determinación de Metalotioneína por
Espectrofotometría de Absorción
Atómica (154) (Esta técnica esta descrita
en el apartado 3.2.3 de material y métodos)

De tal modo se obtuvieron datos indicativos de la presencia de Metalotioneína , en una serie de fracciones eluidas a través de columna de Sephadex G - 50 .

Con las mismas , se obtuvo un Espectro U.V. , verificando un barrido entre las longitudes de onda de 200 a 300 nm .

A partir de los K_r de las proteínas standard y de la masa molecular relativa de las citadas ; se procedió a la representación gráfica , determinandose la M_r de la proteína de estudio , interpolando su K_r en la recta resultante.

En las fracciones donde se obtuvo un pico , se aislaron a través de Cromatografía Líquida de Baja Presión , en columna analítica , recogiendo los picos eluidos a los distintos tiempos de retención , para confirmar su polimorfismo.

El equipo utilizado lo constituye :

- . Columna específica Glas Pac
- . Bomba para HPLC modelo 64
- . Detector U.V. as 220 nm Milton Roy 3.100
- . Integrador Milton Roy CI 4.100

La presión de la bomba fué mínima de 0 bar y la máxima 1.5 bar

6 - SEPARACION DE ISOMETALOTIONEINAS POR CROMATOGRAFIA

LIQUIDA DE ALTA PRESION :

6.1.- Fundamento :

Método físico de separación por distribución en dos fases .

A través de la fase estacionaria se desliza una fase móvil.

Existe una fase estacionaria , adherida a la superficie del relleno , de forma pelicular .

La fase estacionaria suele ser Polar

La separación se logra , por participación de la muestra disuelta entre la fase estacionaria y la fase móvil .

La Cromatografía Líquida de Alta Presión , se conoce como HPLC , actualmente se enclava entre la técnica mas extendida , en el análisis y separación de muestras .

La fase reversa esta constituida por :

- . Fase Móvil : De carácter Polar
- . Fase Estacionaria : No Polar

El equipo utilizado lo constituyen :

- . Columna especifica para HPLC " DELTAPAK C4 "
- . Bomba de HPLC modelo Kontron 420
- . Formador de gradiente para HPLC Kontron 425
- . Detector U.V. a 220 nm Knauer
- . Ordenador modelo Acer 500
- . Integrador Milton Roy CI 4000

Debido a la sensibilidad y precisión del sistema , se llevo a cabo con reactivos cualificados para su realización .

Se realizó con extractos de Cerebro , Mucosa Intestinal y Médula Osea .De ratas sometidas a los distintos tratamientos , reseñados con anterioridad .

Los homogenados se realizaron con tampón Tris - ClH
25 mM , pH = 7.4 (p : v , 1 : 2)

Los picos proteicos procedentes del último paso reseñado , cumplan las características propias de la Metalotioneina , sometiéndose a otra posterior elución en columna analítica , en conexión con el equipo de HPLC

Su elución se verificó con gradiente , formado por dos disoluciones amortiguadoras :

Tampón A : Tris- ClH 25 mM ; pH 7.4

Tampón B : Tampón A en proporción 80 % de Acetonitrilo

A continuación detallamos el flujo y el gradiente empleado :

TIEMPO (min)	FLUJO (ml/min)	TAMPON A (%)	TAMPON B (%)
0.0	0.5	100	0
5.0	0.5	100	0
90.0	0.5	0	100
100.0	0.5	0	100
110.0	0.5	100	0
120.0	0.5	100	0
120.1	0.0	100	0

La bomba efectuó su función entre un mínimo de 0 bar y máximo de 150 bar .

Las fracciones eluidas a través de la citada columna , se recogieron en un colector de fracciones Ultra Rac .

Las fracciones proteicas fueron detectadas a una longitud de onda de 220 nm , en consonancia con la técnica empleada por Hunziker y Kägi (64bis) , empleado para la separación de Metalotioneina en Hígado Humano .

7.- ESTUDIO ESTADISTICO :

Se procedio al calculo de la Media (\bar{X}) , Desviación Standard de los valores medios (S) , asi como a la determinación de la significación estadística respecto a grupos control , por el procedimiento estadístico conocido por " t de Student " (t)

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N_i}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N}}$$

$$t = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

La recta de regresión correspondiente a los valores medios de cada grupo , así como su coeficiente de correlación se realizó por el método estadístico de los Mínimos Cuadrados :

$$y = bx + a$$

$$b = \frac{\Sigma xy - \bar{x} \Sigma y}{\Sigma x^2 - \bar{x} \Sigma x}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$r = \frac{n \Sigma x y - \Sigma x \Sigma y}{\sqrt{(n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2) (n \Sigma y^2 - (\Sigma y)^2)}}$$

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS :

1. CONTROL DEL ESTADO ANEMICO :

La evolución de los parámetros fisiológicos estudiados , sufren una transformación rutinaria en el transcurso del desarrollo de la anemia ferropénica , inducida en la elaboración del presente trabajo .

Disminuyen la Hemoglobina , Hematocrito y Fe sérico , en cambio sufre un aumento la capacidad de fijación de Fe en suero , durante el periodo de inducción al estado anémico .

En las tablas 1 , 2 , 3 y en las correspondientes figuras 1 , 2 y 3 se puede observar los valores referentes al curso de inducción del trastorno anémico .

Para ello , consideramos los parámetros fisiológicos , teniendo en cuenta la supervisión de este estado , referido a los animales control

Esta dosis se corresponde con la máxima concentración de metalotioneína , en Cerebro , Mucosa Intestinal y Médula Osea de las ratas control y en estado de anemia ferropénica .(tablas 19 , 18 y 20)

Asi mismo , se obtuvieron valores muy similares de proteínas totales , con las dosis empleadas en el tratamiento , resultando unas diferencias tanto en el grupo control como en el anémico no significativas estadísticamente .

Tales resultados , se contemplan en las tablas 10 y 11 .

Tabla 1 : Valores de Hb durante el proceso de induccion al estado anemico .

Periodo de Inducción a la anemia (dias)	g Hb / 100 ml ratas control	ratas estado anémico	
1	15.75 ± 0.25	14.5 ± 0.5	N.S.
5	15.15 ± 0.15	13.2 ± 0.2	***
10	15.35 ± 0.25	10.15 ± 0.15	***
15	15.1 ± 0.1	9.3 ± 0.3	***
20	15.15 ± 0.05	8.3 ± 0.1	***
25	14.35 ± 0.05	7.2 ± 0.1	***
30	14.7 ± 0.1	7 ± 0.1	***

S.E.: Grado de significación estadística respecto a los controles

N.S.: No Significativo

*** : P < 0.001

Valores de Hemoglobina durante el proceso de induccion a la Anemia

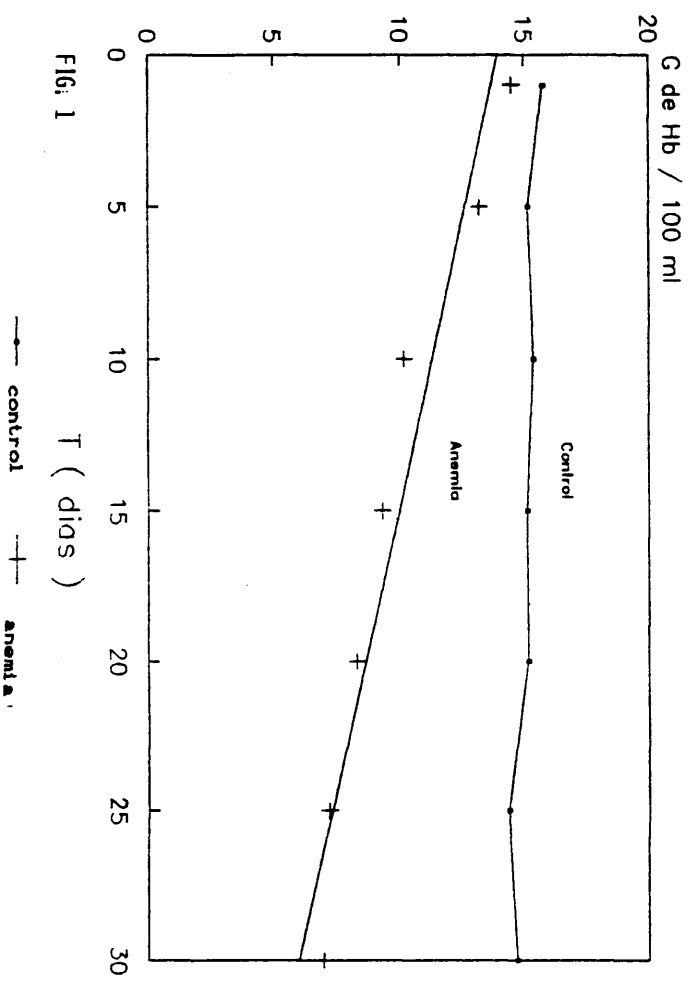


FIG. 1

Tabla 2 : Valores de Hematocrito durante el periodo de induccion al estado anemico

Periodo de inducción a la anemia (días)	Animales Control (% Hto)	Animales en estado anemico (% Hto)	
1	41.5 ± 0.5	40.5 ± 0.5	N.S.
5	40.5 ± 0.5	39.25 ± 0.25	N.S.
10	40.5 ± 0.5	38.25 ± 0.15	*
15	41 ± 1	36.25 ± 0.25	*
20	41.75 ± 0.25	35.75 ± 0.25	***
25	40.5 ± 0.5	27 ± 1	***
30	40.25 ± 0.25	17.5 ± 0.5	***

S.E. : Grado de significación respecto a
controles

N.S.: No significativo

* : P < 0.05

*** : P < 0.001

Valores de Hematocrito durante el proceso de induccion a la Anemia

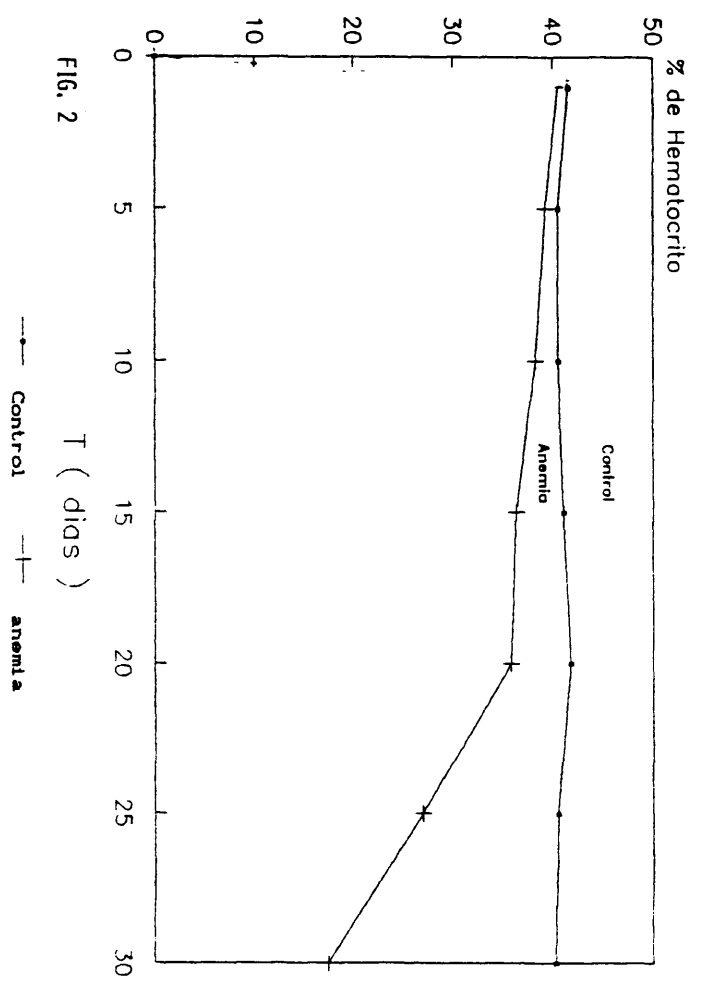


FIG. 2

Tabla 3 : Capacidad de fijación total de Fe en suero durante el proceso de inducción al estado anémico .

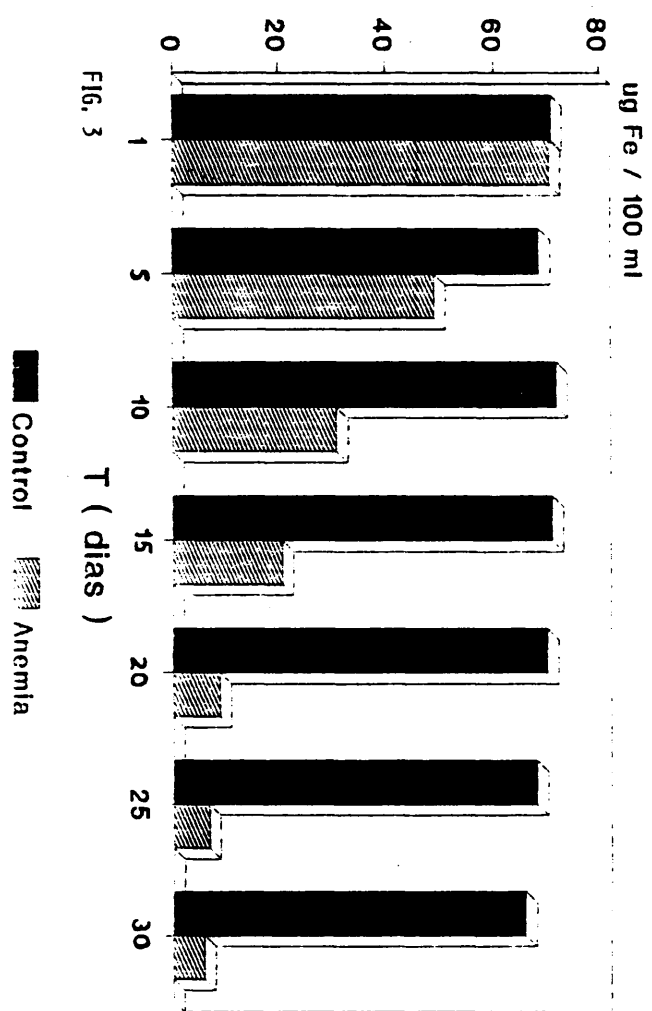
Periodo de inducción a la anemia (días)	Animales Control $\mu\text{g Fe} / 100 \text{ ml}$ suero	Animales en estado anémico $\mu\text{g Fe} / 100 \text{ ml}$ suero	
1	70.9 ± 0.1	70.55 ± 0.65	N.S.
5	68.6 ± 0.4	48.8 ± 0.2	***
10	71.79 ± 0.21	30.9 ± 0.1	***
15	70.95 ± 0.05	20.85 ± 0.15	***
20	69.91 ± 0.09	8.875 ± 0.12	***
25	67.95 ± 0.05	6.795 ± 0.20	***
30	65.82 ± 0.17	5.945 ± 0.05	***

S.E. : Grado de significación respecto
controles

N.S. : No Significativo

*** : $P < 0.001$

Hierro en suero durante el proceso de induccion a la anemia



Proteinemia en ratas Control y en
proceso de induccion a la Anemia

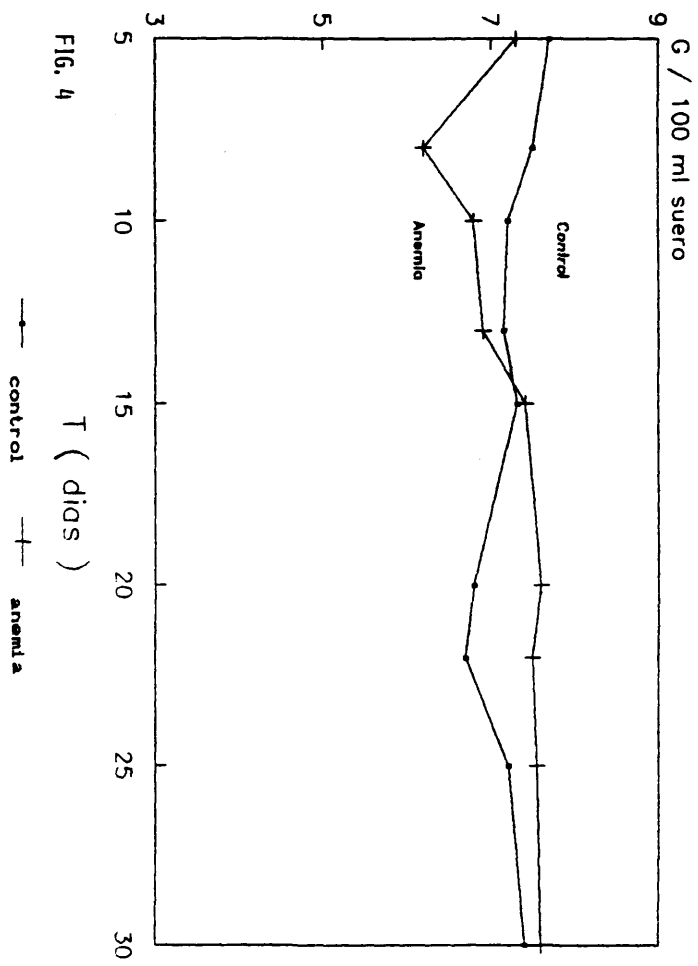


FIG. 4

—●— control —+— anemia

2. CONTROL DEL PESO , ALIMENTACION Y BEBIDA :

Expresamos el peso de los animales en g ., la comida ingerida en g / 100 g rata / día y el agua de bebida en ml / 100 g rata / día . Referente a animales control y en los sometidos al proceso de inducción de anemia ferropénica , a lo largo del proceso indicado , se reseñan en las tablas 4 , 5 y 6 y en las figuras 5 , 6 y 7 .

Tabla 4 : Peso en g de ratas control y sometidas al estado de anemia ferropénica

Periodo de inducción a la anemia (días)	Animales Control (g peso / rata)	Animales en estado anémico (g peso / rata)	
2	180.5 ± 0.1	185 ± 1	***
4	176 ± 1	186.5 ± 1.5	***
6	193 ± 1	197 ± 1	***
8	188 ± 1	199.5 ± 0.5	***
10	197.5 ± 1.5	199.5 ± 0.5	N.S.
12	214.5 ± 0.5	190.1 ± 0.1	***
14	210.35 ± 10.35	199.5 ± 0.5	N.S.
16	224.45 ± 0.95	209.75 ± 0.55	***
18	231.25 ± 0.75	200.05 ± 0.25	***
20	236.25 ± 1.75	198.65 ± 1.15	***
22	241.15 ± 1.35	200 ± 1	***
24	250.33 ± 0.91	209.8 ± 0.2	***
26	260.95 ± 0.45	213.55 ± 1.05	***

S.E.: Grado de Significación

N.S.: No Significativo

*** : $P < 0.001$

Peso en grs de ratas Control y en proceso de induccion a la Anemia

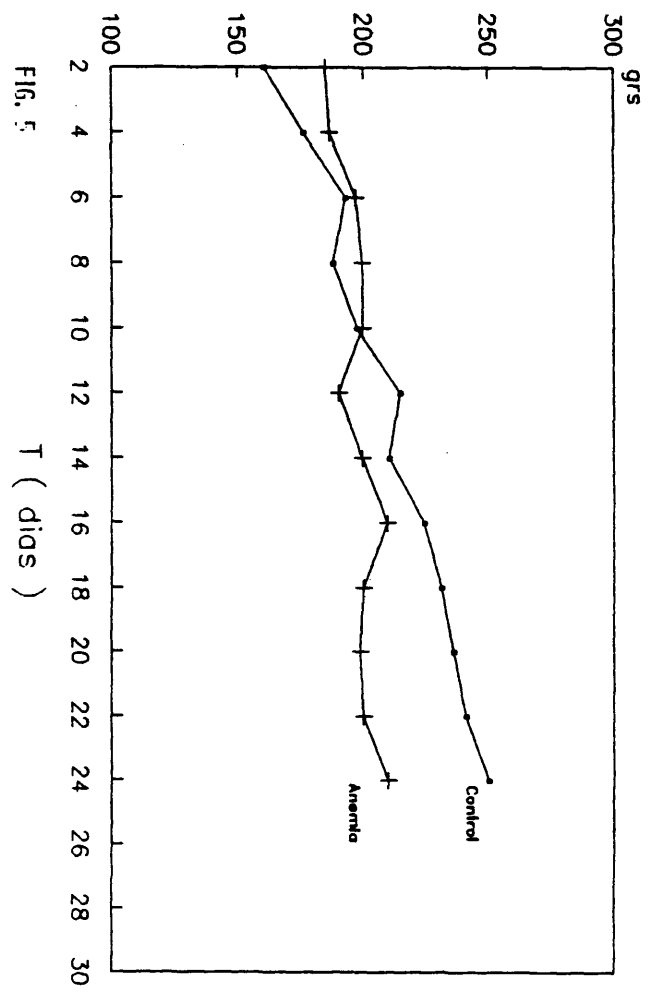


FIG. 5
Control Anemia

Tabla 5 : Alimento ingerido en g / 100 g rata / día
en los grupos de estudio , durante el periodo
de inducción al proceso anémico

Periodo de inducción a la anemia (días)	Animales Controles (g /100g rata /día	Animales en estado anémico Kg/100g rata /día)	
1	12.75 ± 0.13	6.87 ± 0.02	***
2	12.92 ± 0.03	6.91 ± 0.04	***
4	11.82 ± 0.007	8.79 ± 0.09	***
6	12.57 ± 0.27	6.97 ± 0.13	***
8	12.71 ± 0.39	8.94 ± 0.15	***
10	11.78 ± 0.13	7.77 ± 0.19	***
12	11.69 ± 0.05	6.88 ± 0.02	***
14	10.58 ± 0.06	8.28 ± 0.03	***
16	10.22 ± 0.025	10.49 ± 0.01	***
18	10.75 ± 0.05	10.3 ± 0.1	***
20	8.8 ± 0.1	10.2 ± 0.1	***
22	9.55 ± 0.05	8.6 ± 0.2	***
24	9.5 ± 0.2	10.25 ± 0.04	***
26	10.25 ± 0.15	11.05 ± 0.05	***

S.E.: Grado de Significación

*** : P < 0.001

Ingestion de Comida en g/100 g rata/dia
 en el proceso de Induccion a la Anemia

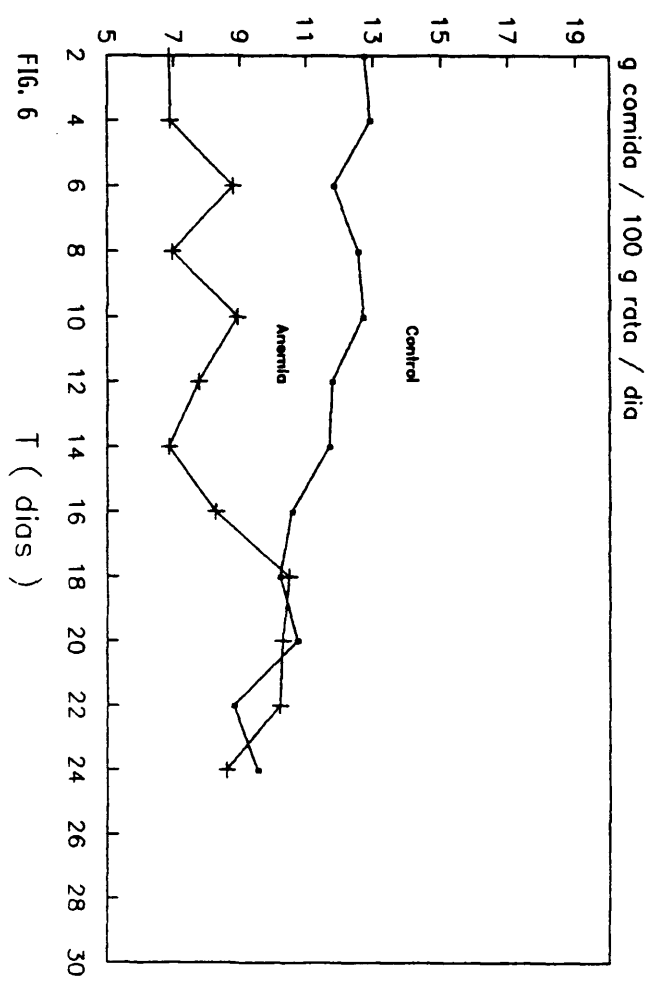


FIG. 6
 T (dias)
 Control —●—
 anemia —+—

Tabla 6 : Agua de Bebida en ml / 100 g rata / día en los grupos de animales en estudio durante el periodo de inducción a la anemia .

Periodo de inducción a la anemia (días)	Animales Control (ml/100g rata / día)	Animales en estado anémico (ml/100g rata/día)	
2	12.5 ± 0.1	10.05 ± 0.05	***
4	15.3 ± 0.15	24.45 ± 0.15	***
6	13.3 ± 0.1	18.4 ± 0.2	***
8	13.7 ± 0.2	18.7 ± 0.5	***
10	10.25 ± 0.25	13.3 ± 0.2	***
12	13.95 ± 0.05	17.45 ± 0.05	***
14	10.25 ± 0.15	22.2 ± 0.1	***
16	10.3 ± 0.1	19.1 ± 0.1	***
18	12.5 ± 0.1	19.35 ± 0.15	***
20	9.6 ± 0.2	18.1 ± 0.1	***
22	10.1 ± 0.1	25.5 ± 0.25	***
24	10.25 ± 0.05	23.5 ± 0.15	***
26	8.3 ± 0.1	20.65 ± 0.15	***

S.E.:Grado de Significación

*** : P < 0.001

Ingestion de Agua en ml/100 g rata/dia
en el proceso de induccion a la Anemia

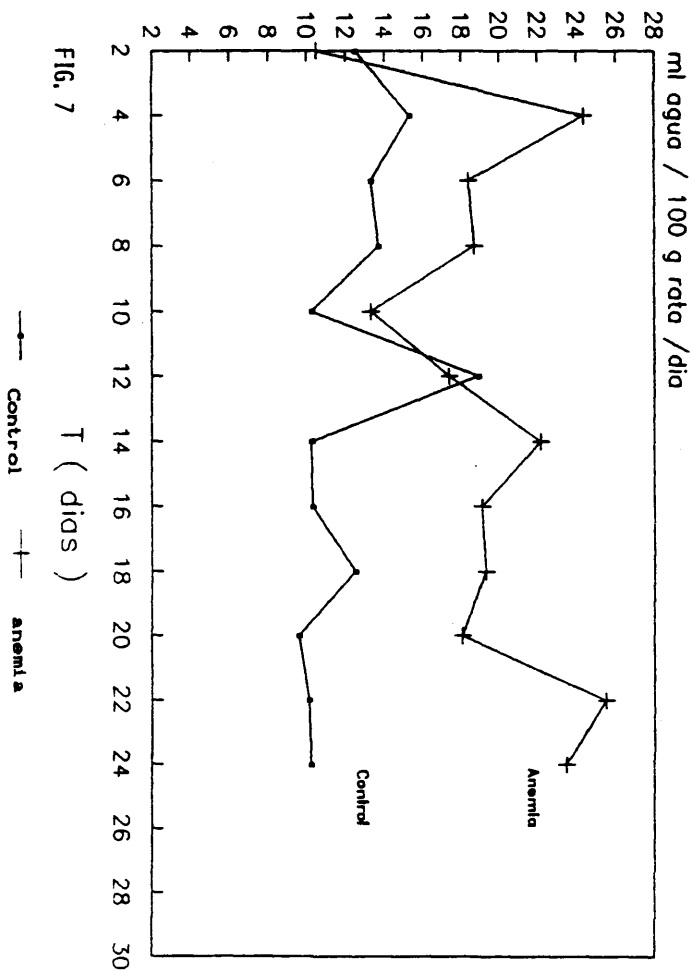


FIG. 7

Como podemos observar en la tabla 4 y figura 5 , la diferencia de peso en ambos grupos de animales es manifiesta a partir del día 12

En la tabla 5 y figura 6 , la ingestión de alimento por el grupo control y el de estudio , resulta patente los 14 primeros días del proceso inductor de anemia ferropénica , en días sucesivos , los valores son muy similares en ambos grupos .

Por ello , es posible culmine la adaptación de los animales sometidos al estado de anemia ferropénica .

En la tabla 6 y figura 7 , comprobamos la diferencia de agua ingerida en dichos grupos .

Los animales en trastorno anémico consumen mayor cantidad de agua respecto de los controles , debido a las necesidades de reposición de la Volemia .

3. ELECCION DE LA DOSIS DE CADMIO :

Los resultados están contenidos en una serie de tablas donde se refleja el grupo de animales sometidos a este tratamiento y el número de días del citado , consistiendo la dosis en 1 mg Cd / kg rata / día , administrado a partir de una disolución estable de Cl_2Cd , mediante sonda intragástrica .

Se realizó, con los datos obtenidos , mediante los procedimientos estadísticos reseñados en Material y Métodos , el valor medio de cada lote experimental , desviación standard de la media y la significación estadística (" t de student ")

Partiendo de los valores medios , se hace la representación gráfica de los puntos correspondientes a los distintos pasos y parámetros de los experimentos realizados , observandose el consiguiente comportamiento de los distintos grupos .

3.1- Tratamiento con Hierro Radiactivo :

En la tabla 7 observamos la incorporación de Fe estable y radiactivo (radionucleido - 59), administrado en dosis de $2 \mu\text{ci.}$, por vía intra cerebro ventricular , durante 2 días .

El grupo correspondiente a ratas anémicas , presenta mayor nivel de radioactividad , a los 2 días de su administración respecto a los controles , como podemos comprobar en la figura 8

Tabla 7 : c p m de Fe - 59 / g en ratas control y anémicas , despues de administracion por via intracerebro ventricular

Grupos de Animales	Organos	Experiencia Basal	2 dosis de Fe estable
Ratas control			
	M. Intes.	1476 \pm 6.	303460 \pm 90
	Encefalo	25725. 1 \pm 78. 9	488202. 6 \pm 5
	Cerebelo	20405. 1 \pm 5	387117. 5 \pm 5
	M. Oblon.	110. 35 \pm 0. 1	14531 \pm 0. 12
	M. Osea	126. 39 \pm 0. 10	20508. 5 \pm 1. 2
		Ratas	Anémicas
	M. Intes.	2313. 5 \pm 54 ***	523677. 9 \pm 54 **
	Encefalo	23808. 2 \pm 35 **	2082719. 2 \pm 48 N. S.
	Cerebelo	4586. 5 \pm 10 ***	3698866. 6 \pm 6 ***
	M. Oblon.	10871. 8 \pm 2 ***	28132. 5 \pm 6 ***
	M. Osea	679. 6 \pm 5 ***	52269 \pm 5 ***

S.E. : Grado de Significación respecto a
controles

*** : $P < 0.001$

** : $P < 0.01$

N.S. : No Significativo .

c.p.m. de Fe-59 / g en ratas control y anemicas . 2 D. Intracerebro Ventricular

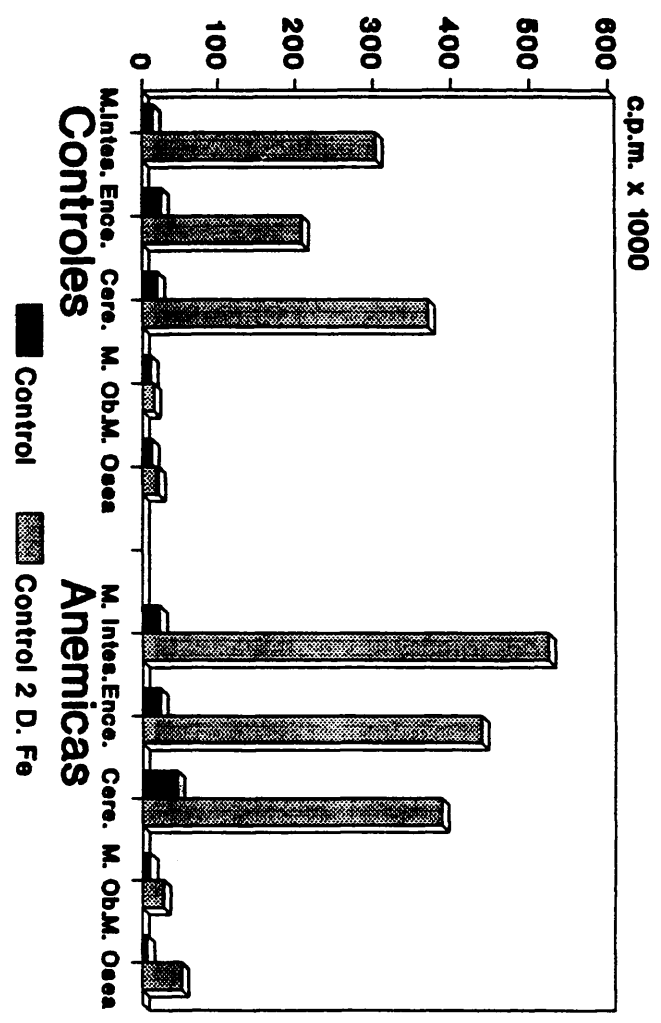


Fig. 8

Tabla 8 : mg de proteínas totales / g en ratas Control y Anémicas tratadas con distintas dosis de 1 mg Cd / kg rata / día , administrado intragastricamente por sonda .

Técnica de Lowry modificada por Hartree .

Grupos de Organos Animales	Experiencia Basal	4-dosis de Cd estable	6-dosis de Cd estable

Ratas Control			
M. Intes.	6.42±0.7	7.21±0.6	9.04±0.5
Cerebelo	7.21±0.9	9.9±0.6	11.2±1
Encefalo	6.58±0.6	8.16±0.3	9.6±1
Corteza	6.77±0.4	9.7±1.2	10.3±2
M. Oblon.	1.75±0.23	2.16±0.27	2.28±1
M. Osea	4.26±0.4	7.18±0.6	7.61±0.7
Ratas Anémicas			
M. Intes.	8.13±0.38	8.15±0.32	9.65±0.9
	***	***	***
Cerebelo	8.8±0.26	10.4±0.4	12.11±1
	***	***	**
Encefalo	5.05±0.4	8.4±0.3	8.8±0.3
	***	N. S.	***
Corteza	9.7±0.2	9.9±0.5	10.9±2
	***	N. S.	***
M. Oblon.	2.2±0.1	1.87±0.5	4.14±0
	***	N. S.	***
M. Osea	6.7±0.4	9.8±0.2	10.52±0.6
	***	***	***

S.E.: Grado de Significación respecto a
controles .

*** : $P < 0.001$

** : $P < 0.01$

* : $P < 0.05$

N.S.: No Significativo .

Proteínas Totales en ratas Control y Anémicas, tratadas con distintas D. Cd

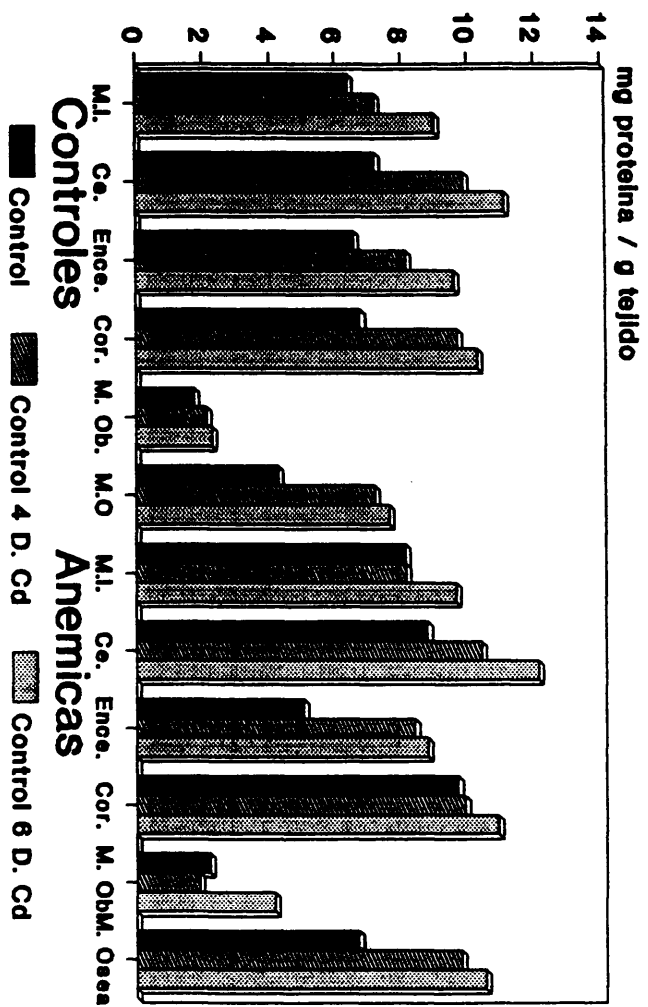


Fig.9

En las tablas 9 y 10 así como en las figuras 10 y 11 , se contemplan los valores de Hemoglobina y Hematocrito durante el periodo de tratamiento con metales , (Cd y Fe) tanto en animales control como en estado anémico .

Tabla 9 : Valores de Hemoglobina en ratas Control y Anémicas en el periodo de tratamiento con Cd y Fe .

Tratamiento con metales (días)	Cont. + 6 dosis de Cd	Cont. + 6 dosis de Fe	Ane. + 6 dosis de Cd	Ane. + 6 dosis de Fe
1	14.19±0.03	15.25±0.15	6.95±0.05 ***	11.5±0.05 ***
2	12.1±0.1	14.95±0.05	6.1±0.1 ***	12.09±0.09 ***
4	9.9±0.1	12.1±0.1	5.6±0.3 ***	11.2±0.2 ***
6	7.9±0.1	8.95±0.05	3.65±0.15 ***	7.1±0.1 ***

S.E. : Grado de Significación respecto a controles

*** : P < 0.001

Hemoglobina en los grupos de estudio durante el tratamiento con metales

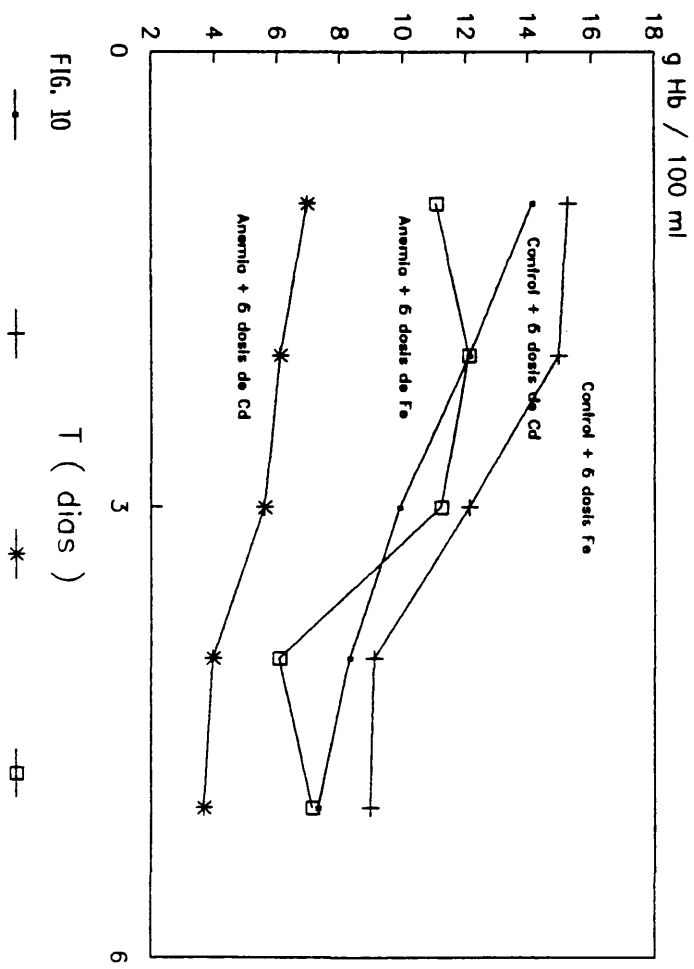


FIG. 10

Tabla 10 : Valores de Hematocrito en ratas Control y en estado anémico durante el tratamiento con Fe y Cd .

Tratamiento con metales (días)	Cont. + 6 dosis de Cd	Cont.+ 6 dosis de Fe	Ane.+ 6 dosis de Cd	Ane. + 6 dosis de Fe
3	38.5±0.5	40.5±0.5	29.5±0.5 ***	35.5±0.5 ***
6	37.5±0.5	41.5±0.5	21.5±0.5 ***	39.5±0.15 ***

S.E. : Grado de Significación respecto a controles

*** : P < 0.001

Como podemos apreciar , el Cd agudiza el trastorno anémico , experimentando una disminución tanto la concentración de Hematocrito como de Hemoglobina en ambos grupos de trabajo .

En cambio el Fe repone los parametros fisiológicos desviados durante el proceso del estado de Anemia ferropénica .

Hematocrito en los grupos de estudio durante el tratamiento con metales

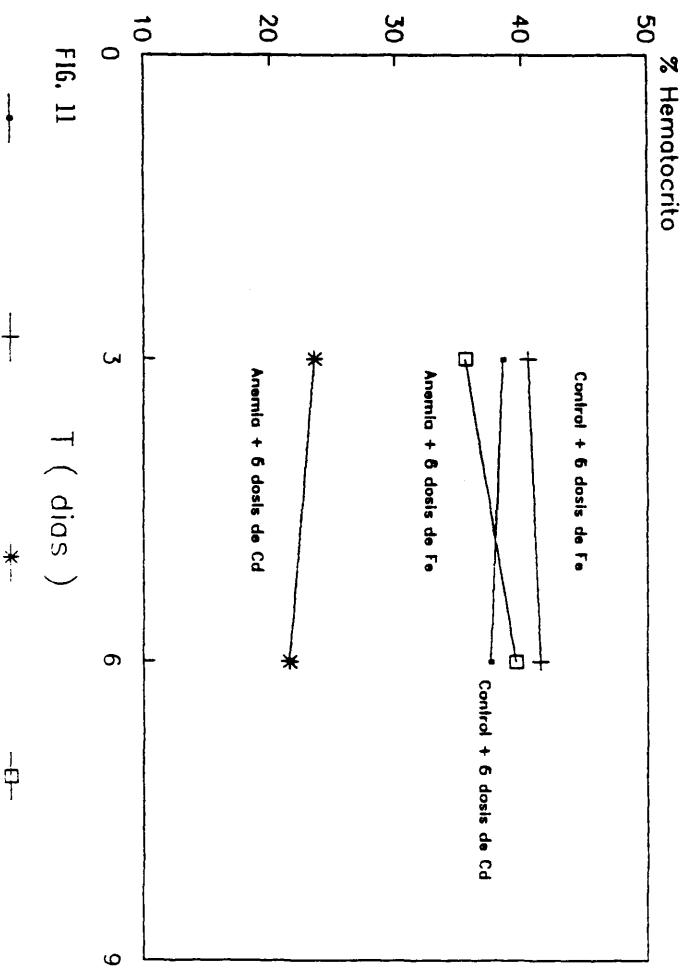


FIG. 11

4.- PURIFICACION DE LA METALOTIONEINA EN RATAS CONTROLES Y ANEMICAS SOMETIDAS A TRATAMIENTO CON METALES :

Las concentraciones de Proteinas totales y Metalotioneina , procedentes de los extractos de Mucosa Intestinal Cerebro y Médula Osea , sometidas a distintos tratamientos , fueron homogenizadas con tampón Tris - Cl H 25 mM ; pH = 7.4 (1:2 , P : V) centrifugados a 40.000 r.p.m. durante 60 minutos , se indican en las tablas 11, 12 y 13 , asi como en las figuras 13 ,12 y 14 .

Las concentraciones de proteinas , en los diferentes grupos de ratas sometidos a los distintos tratamientos , presentan ligeros aumentos no significativos frente a controles .

El grupo sobresaliente respecto a controles es el sometido a estado anémico recibiendo 6 dosis de Cd .

Asimismo coincide con los niveles más elevados de Metalotioneina en el presente grupo de animales .

Tabla 11 : Proteínas totales en extractos de Mucosa Intestinal, sometidas a distintos tratamientos, homogenizadas con tampón Tris - ClH 25 mM, pH = 7.4 (1 : 2, p : v) centrifugados a 40.000 r.p.m. 60 minutos

Grupo de Animales	mg prot. Totales / g M. Intest.	
Control	8.3 _± 0.1	
Control + 6 dos. Cd	21.135 _± 0.24	N.S.
Control + 6 dos. Fe	3.12 _± 0.4	N.S.
Anemia	26.97 _± 0.43	***
Anemia + 6 dos. Cd	28.07 _± 0.07	***
Anemia + 6 dos. Fe	23.14 _± 0.4	N.S.

S.E. : Grado de Significación Estadística respecto a controles

N.S. : No Significativo

*** : P < 0.001

Proteínas Totales en Mucosa Intestinal

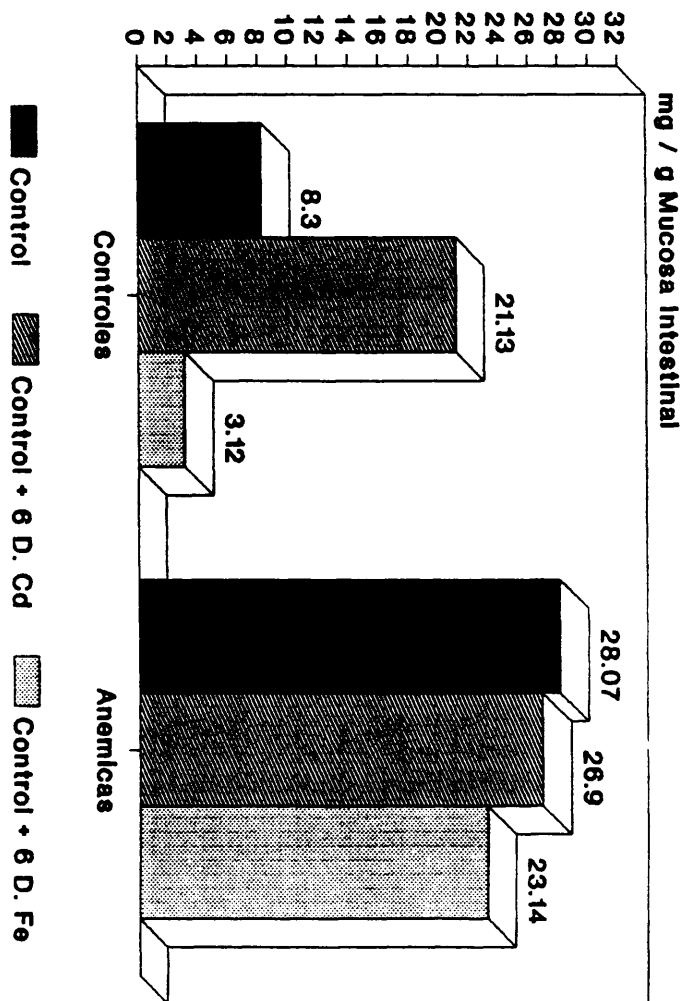


Fig. 13

Tabla 12 : Proteínas totales en extractos de Cerebro , sometidos a distintos tratamientos por homogenización con tampón Tris - ClH 25 mM pH 7.4 (1:2 , p : v) centrifugados a 40.000 r.p.m. durante 60 minutos :

Grupo de Animales	mg prot. Totales / g Mucosa
Control	2.94 ± 0.55
Control + 6 dos. Cd	2.89 ± 0.02 ***
Control + 6 dos. Fe	2.79 ± 0.015 ***
Anemia	3.415 ± 0.55 ***
Anemia + 6 dos. Cd	3.44 ± 0.14 N.S.
Anemia + 6 dos. Fe	3.34 ± 0.015 ***

S.E. : Grado de Significación Estadística respecto a controles

N.S.: No Significativo

*** : P < 0.001

Proteínas Totales en Cerebro

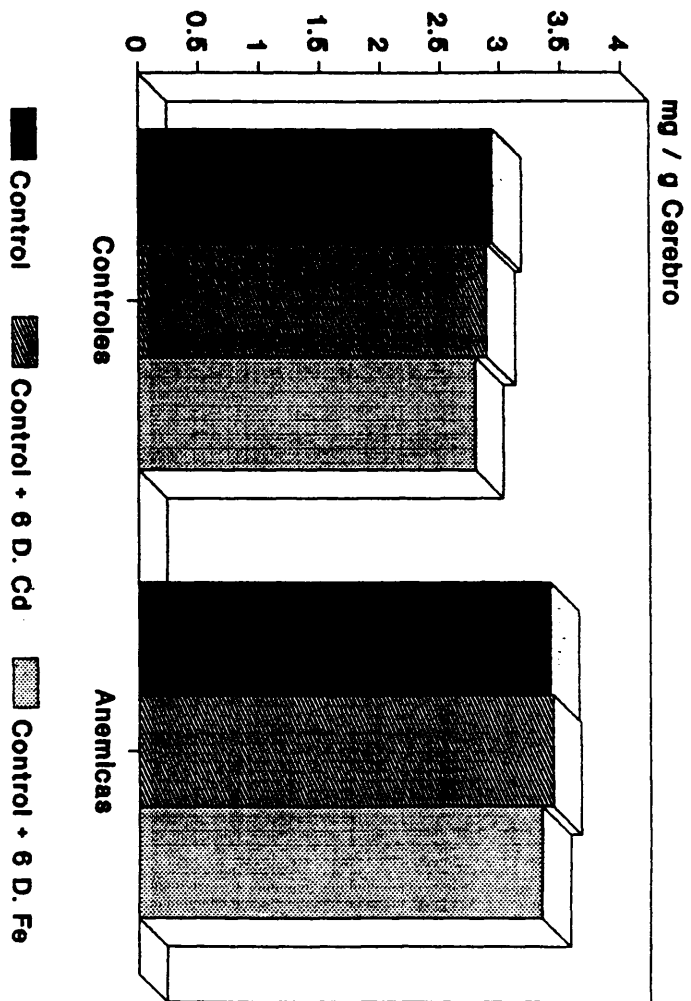


Fig 12

Tabla 13 : Proteínas totales en extractos de Médula Osea sometidos a distintos tratamientos , homogenizados con tampón Iris - ClH 25 mM pH 7.4 (1 : 2 , p : v) centrifugados a 40.000 r.p.m. durante 60 minutos.

Grupo de Animales	mg de prot. Totales / g Medula Osea
Control	0.339 ± 0.01
Control + 6 dos. Cd	2.13 ± 0.02 ***
Control + 6 dos. Fe	1.26 ± 0.02 ***
Anemia	0.705 ± 0.05 ***
Anemia + 6 dos. Cd	2.62 ± 1.51 ***
Anemia + 6 dos. Fe	2.23 ± 0.89 ***

S.E. : Grado de Significación Estadística
Respecto a controles

*** : P < 0.001

Proteínas Totales en Medula Osea

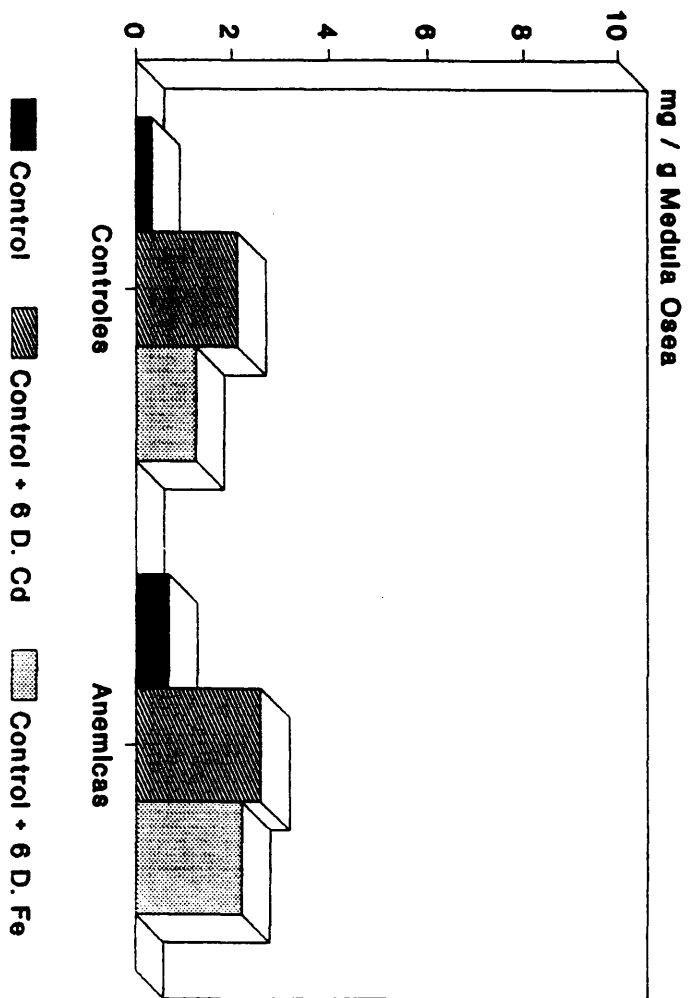


Fig. 14

Tabla 14 : μg de Cd estable / g cerebro detectado en ratas Control y Anémicas a partir de administración de distintas dosis de 1 mg Cd / kg rata / día por vía Intragastrica .

Grupo Animales	Experiencia Basal	3-dosis de Cd estable	6-dosis de Cd estable
ratas control	0.37 ± 0.005	0.6 ± 0.01	0.76 ± 0.017
ratas anémicas	0.90 ± 0.05	0.931 ± 0.015	0.96 ± 0.015
	N.S.	***	***

S.E.: Significación Estadística respecto a Controles

*** : $P < 0.001$

N.S.: No Significativo

Administración de distintas dosis de Cd en Cerebro de ratas Control y Anémicas

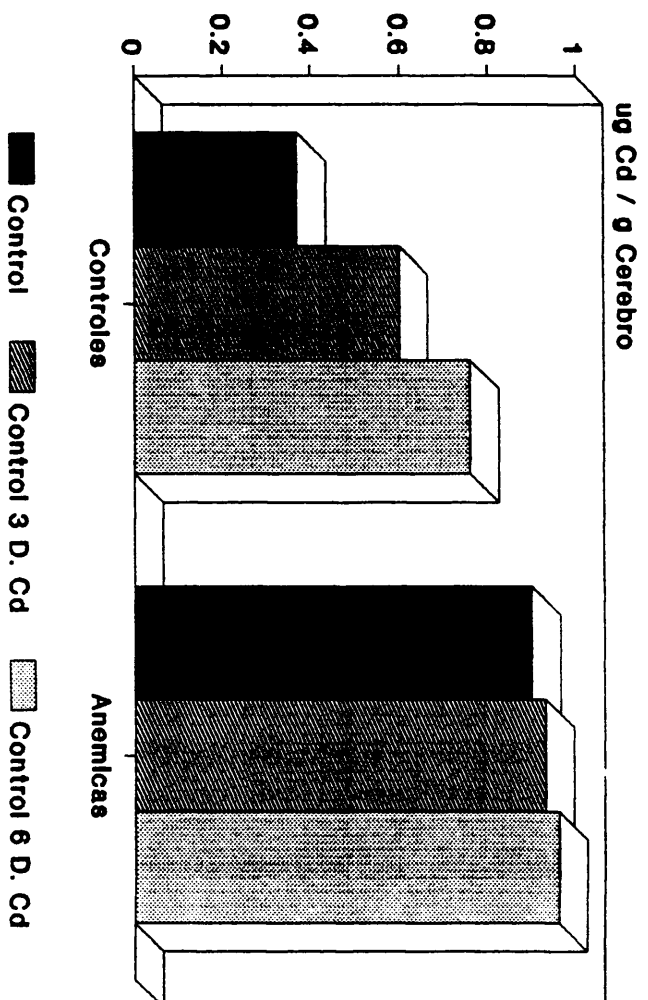


Fig. 15

Tabla 15 : μg de Cd estable / g de M. I. detectado en ratas Control y Anémicas a partir de administración de distintas dosis de 1 mg Cd / kg rata / día por vía intragastrica .

Grupo de animales	experiencia basal	3-dosis de Cd estable	6-dosis de Cd estable
ratas control	0.86 \pm 0.02	0.96 \pm 0.001	0.961 \pm 0.001
ratas anémicas	0.91 \pm 0.001 *	0.98 \pm 0.002 **	0.99 \pm 0.005 *

S.E. : Significación Estadística respecto a controles

** : $p < 0.01$

* : $p < 0.05$

Administración de distintas dosis de Cd
en M. lntes. de ratas Control y Anémicas

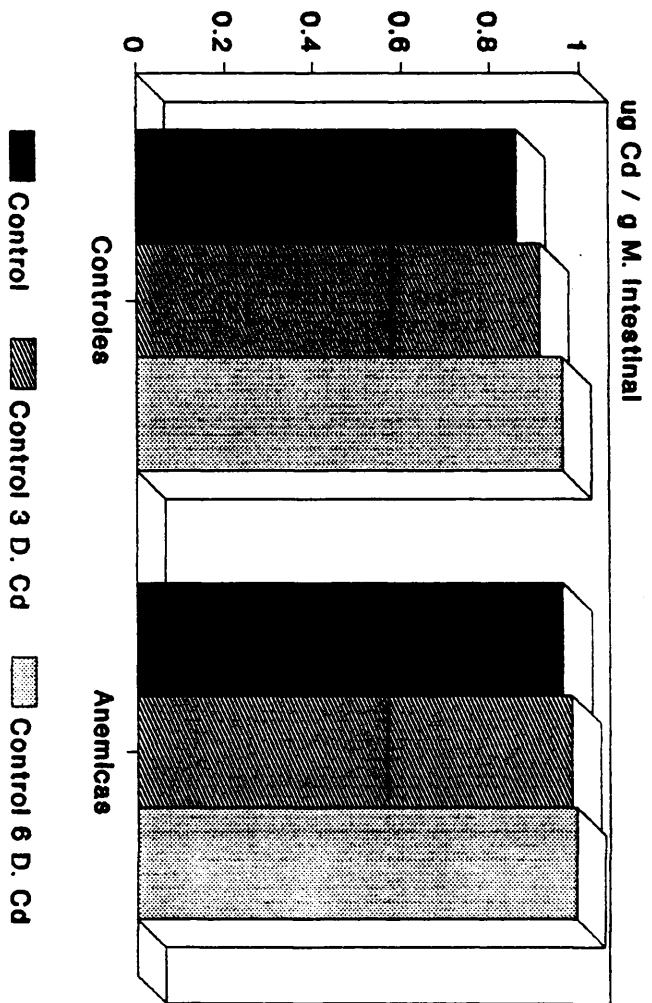


Fig. 16

Tabla 10 : μg de Cd estable / g M.O. detectado en ratas Control y Anémicas a partir de administración de distintas dosis de 1 mg Cd / kg rata / día por vía intragastrica .

grupo de animales	experiencia basal	3-dosis de Cd estable	6-dosis de Cd estable
ratas control	0.33 ± 0.003	0.3 ± 0.001	0.70 ± 0.005
ratas Anémicas	0.61 ± 0.07 *	0.81 ± 0.02 ***	0.87 ± 0.07 ***

S.E. : Significación Estadística respecto a controles

*** : $p < 0.001$

* : $p < 0.05$

Administración de distintas dosis de Cd en M. Osea de ratas Control y Anémicas

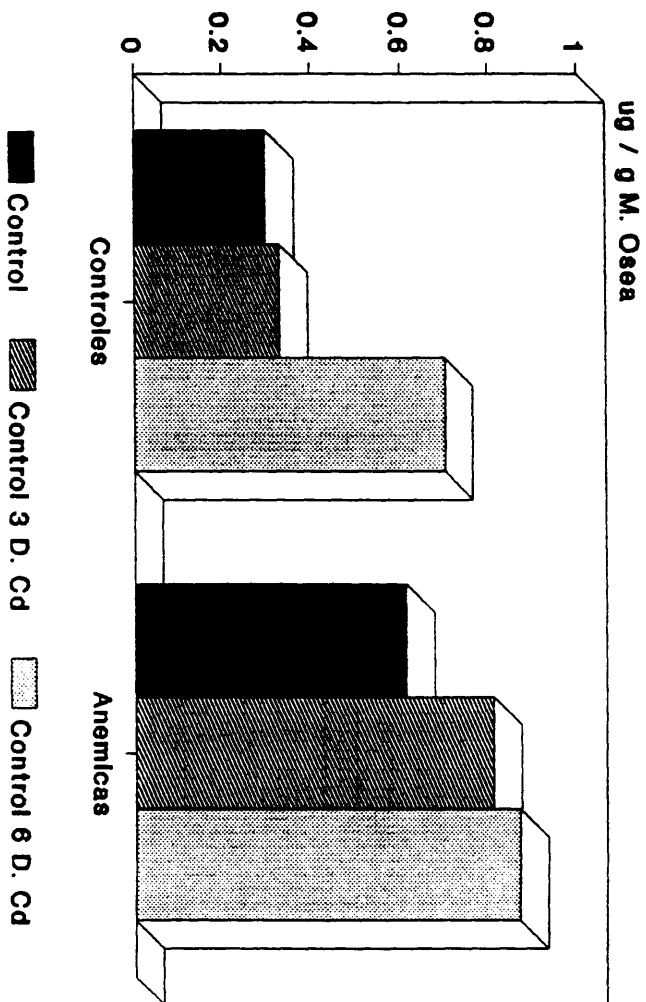


Fig. 17

Tabla 17 : c.p.m. de Fe - 59 / g de tejido en ratas control y anémicas después de administración de 2 μ ci de Fe - 59 administrados por vía intracerebro ventricular dos días antes del sacrificio .

grupo de animales	tejido	c.p.m.Fe - 59 / g tejido

ratas control		
	M.Osea	205.935 \pm 1.2
	Encefalo	208202 \pm 581
	Cerebelo	369.117 \pm 555
	M.Oblongata	110.35 \pm 0.1
	M.Intestinal	1.476 \pm 6
ratas anémicas		
	M.Osea	52.269 \pm 5001 ***
	Encefalo	4382.271 \pm 4806 ***
	Cerebelo	387.886 \pm 5354 ***
	M.Oblongata	1.037 \pm 2.49 ***
	M.Intestinal	2.313 \pm 54.5 ***

S.E. : Significación Estadística respecto a controles
 *** : p < 0.001

c.p.m. de Fe-59 en ratas control y
anemicas. 2 D. Intracerebro Ventricular

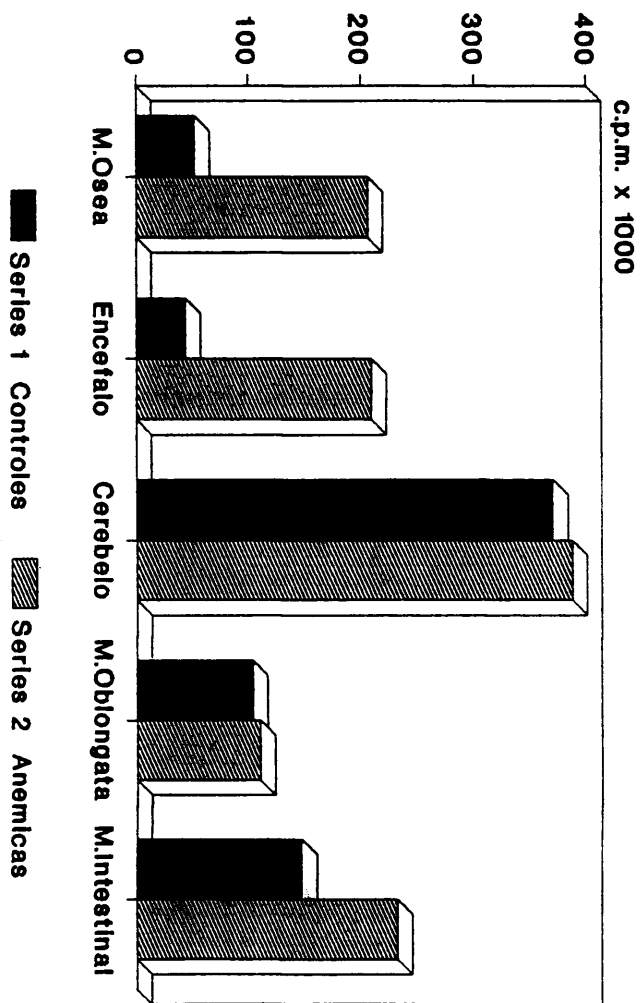


fig. 18

Tabla 18 : Concentración de Metalotioneina en extractos de Mucosa Intestinal de ratas sometidas a distintos tratamientos después de homogenizar y centrifugar en las condiciones reseñadas en material y métodos .

Grupo de Animales	$\mu\text{g Metal/g M. In.}$ (Zahler y Cleland)	$\mu\text{g Metal/g M. In.}$ (E. A. A.)
Control	1.045 ± 0.065	0.65 ± 0.35
Control + 6 do. Cd	10.8 ± 0.2 ***	9 ± 0.1 N.S.
Control + 6 do. Fe	1.015 ± 0.15 N.S.	0.35 ± 0.05 N.S.
Anemia	1.87 ± 0.09 ***	0.145 ± 0.01 N.S.
Anemia + 6 do. Cd	10.95 ± 0.15 ***	10.425 ± 0.06 N.S.
Anemia + 6 do. Fe	1.125 ± 0.275 **	0.73 ± 0.04 ***

S.E. : Grado de significación respecto a Controles .

*** : $P < 0.001$

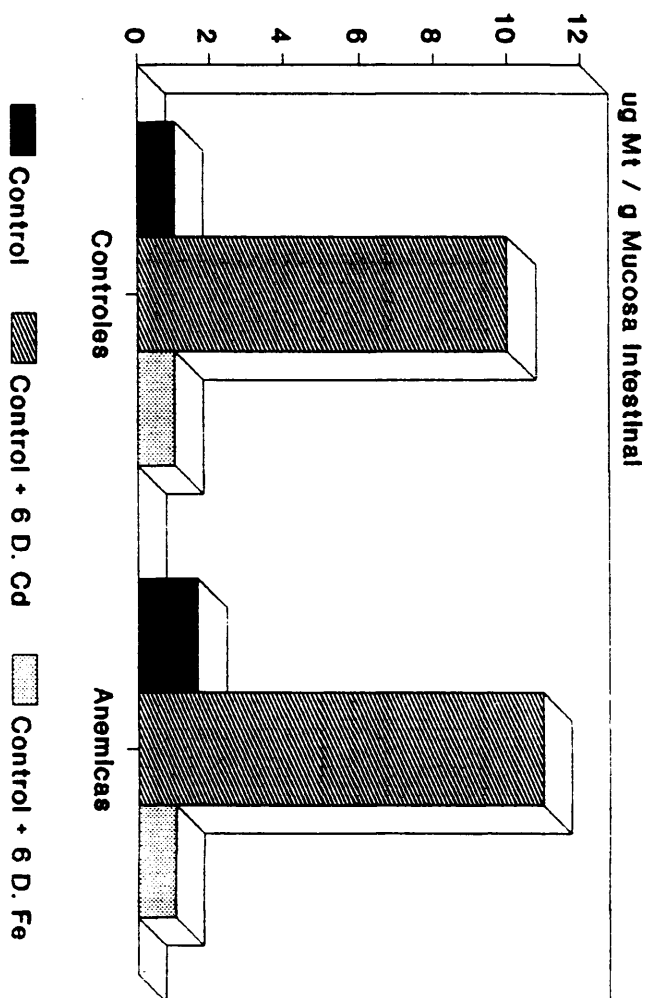
** : $P < 0.01$

N.S. : No Significativo

. Zahler y Cleland : Determinación de Metalotioneina por el método de grupos disulfuro .

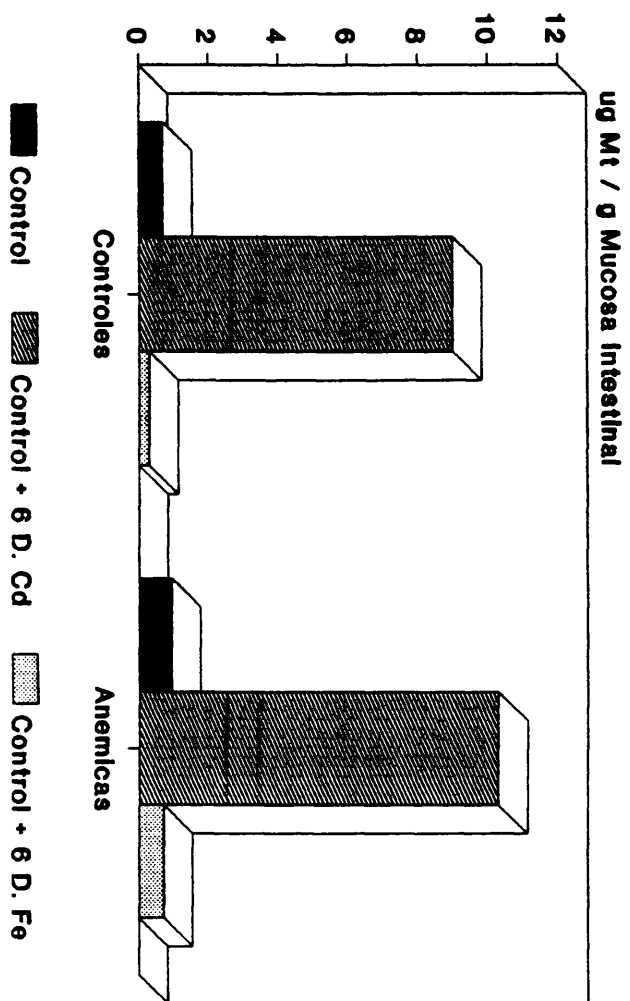
. E.A.A. : Valoración de Metalotioneina por saturación con Cd y posterior determinación del citado por Espectroscopia de Absorción Atomica .

Concentracion de Metalotioneina en Mucosa Intestinal



Zahler y Cleland Fig.19

Concentracion de Metalotioneina en Mucosa Intestinal



E.E.A. (Espectroscopia Absorcion
Atomica) Fig. 20

Tabla 19 : Concentración de Metalotioneina en extractos de Cerebro de ratas sometidas a distintos tratamientos , después de homogenizar y centrifugar en las condiciones reseñadas en material y métodos

Grupo de Animales	$\mu\text{g Metal/g Cerebro}$ (Zahler y Cleland)	$\mu\text{g Metal/g cerebro}$ (E. A. A.)
Control	3 ± 0.44	0.14 ± 0.05
Control + 6 do. Cd	3.49 ± 0.44 ***	0.42 ± 0.01 ***
Control + 6 do Fe	2.43 ± 0.31 ***	0.33 ± 0.06 ***
Anemia	3.47 ± 0.12 ***	0.7 ± 0.1 **
Anemia + 6 do. Cd	5.38 ± 0.06 N.S.	0.95 ± 0.05 ***
Anemia + 6 do. Fe	2.45 ± 0.45 **	0.43 ± 0.1 ***

S.E. : Grado de Significación Estadística respecto a Controles .

*** : P < 0.001

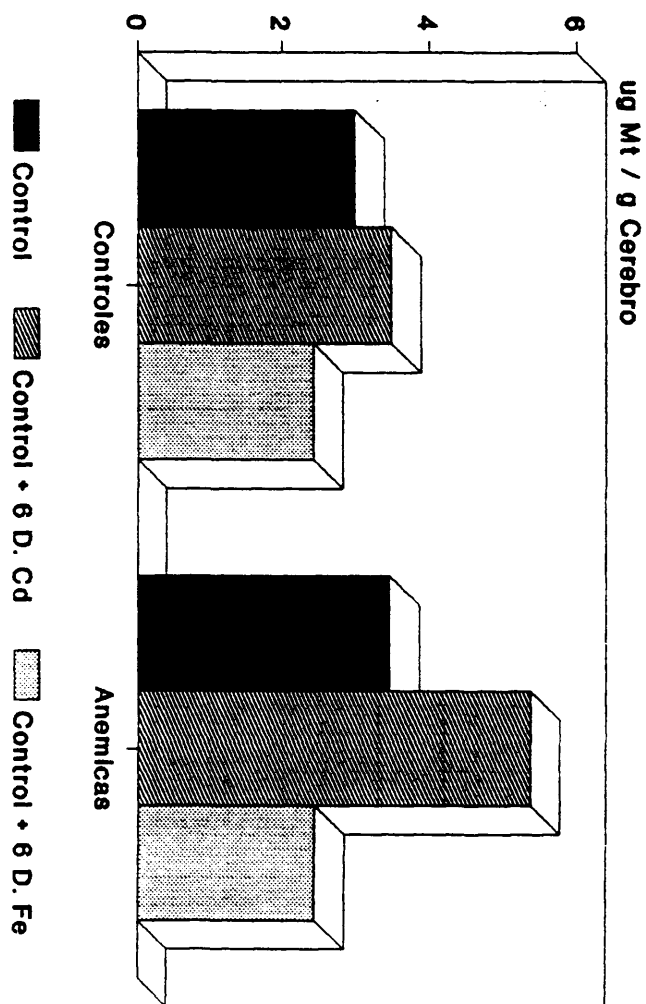
** : P < 0.01

N.S.: No Significativo .

Zahler y Cleland : Determinación de Metalotioneina por el
método de grupos disulfuro .

E. A. A. : Valoración de Metalotioneina por saturación con Cd y
posterior determinación del citado por
Espectroscopia de Absorción Atomica .

Concentracion de Metalotioneina en Cerebro



Zahler y Cleland Fig. 21

Concentracion de Metalotioneina en Cerebro

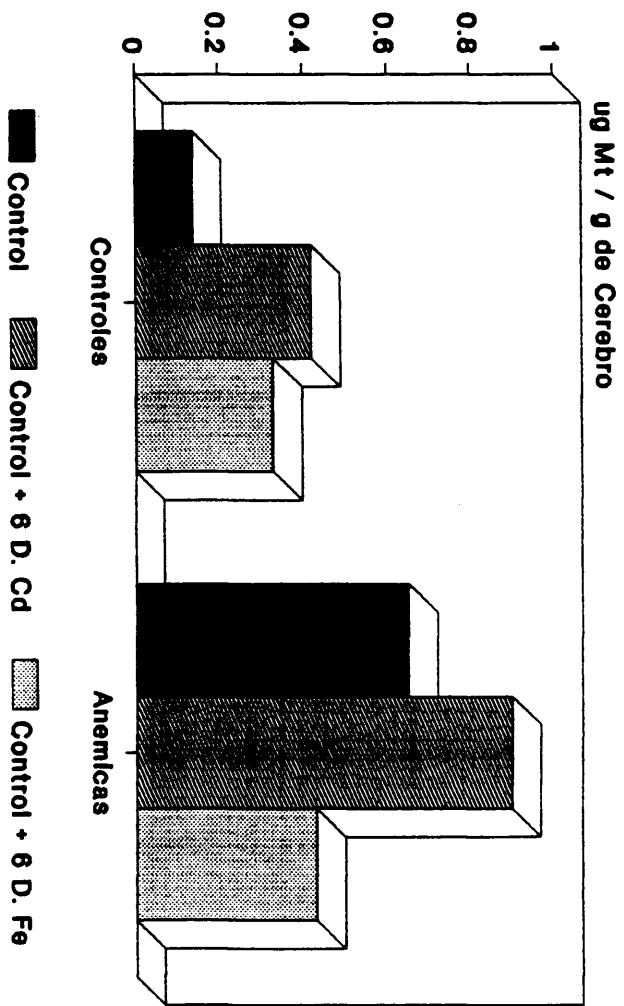


Tabla 20 : Concentración de Metalotioneina en extractos de Médula Osea de ratas sometidas a distintos tratamientos , después de homogenizar y centrifugar en las condiciones reseñadas en material y métodos

Grupo Animales	$\mu\text{g Metal.} / \text{g M.O.}$ (Zahler y Cleland)	$\mu\text{g Metal.} / \text{g M.O.}$ (E. A. A.)
Control	0.07 ± 1.36	0.3 ± 0.1
Control + 6 do. Cd	2.65 ± 0.25 ***	2.1 ± 0.3 ***
Control + 6 do. Fe	0.97 ± 0.07 ***	0.22 ± 0.004 **
Anemia	1.74 ± 0.22 ***	0.36 ± 0.01 **
Anemia + 6 do. Cd	3.58 ± 0.06 ***	2.5 ± 0.04 ***
Anemia + 6 do. Fe	2.09 ± 0.11 N.S.	0.43 ± 0.06 N.S.

S.E. : Significación Estadística respecto a Controles

*** : $P < 0.001$

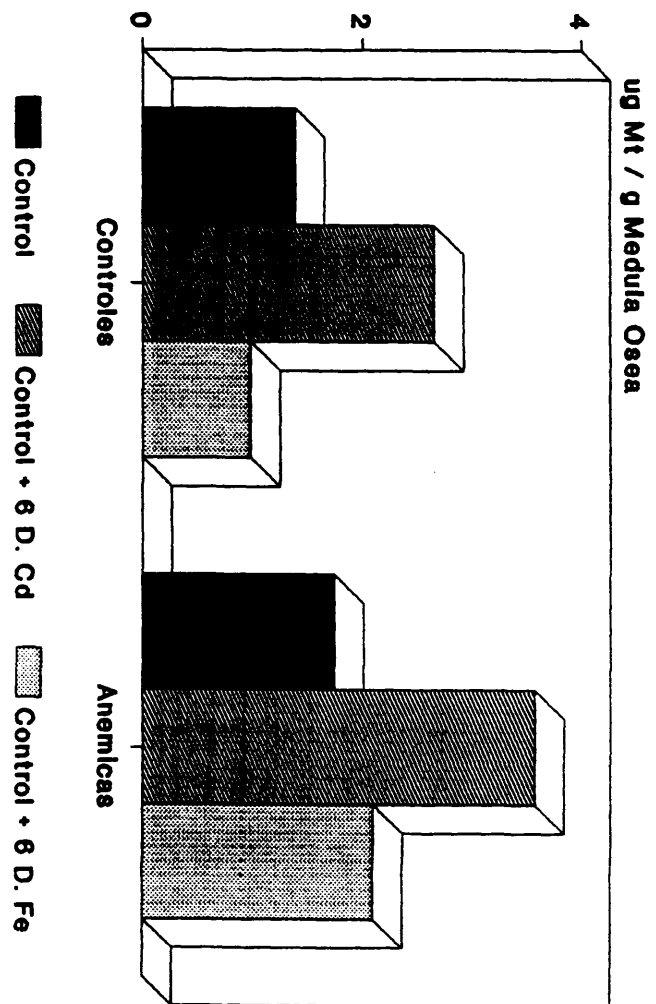
** : $P < 0.01$

N.S. : No Significativo

. Zahler y Cleland : Determinación de Metalotioneina por el método de grupos disulfuro .

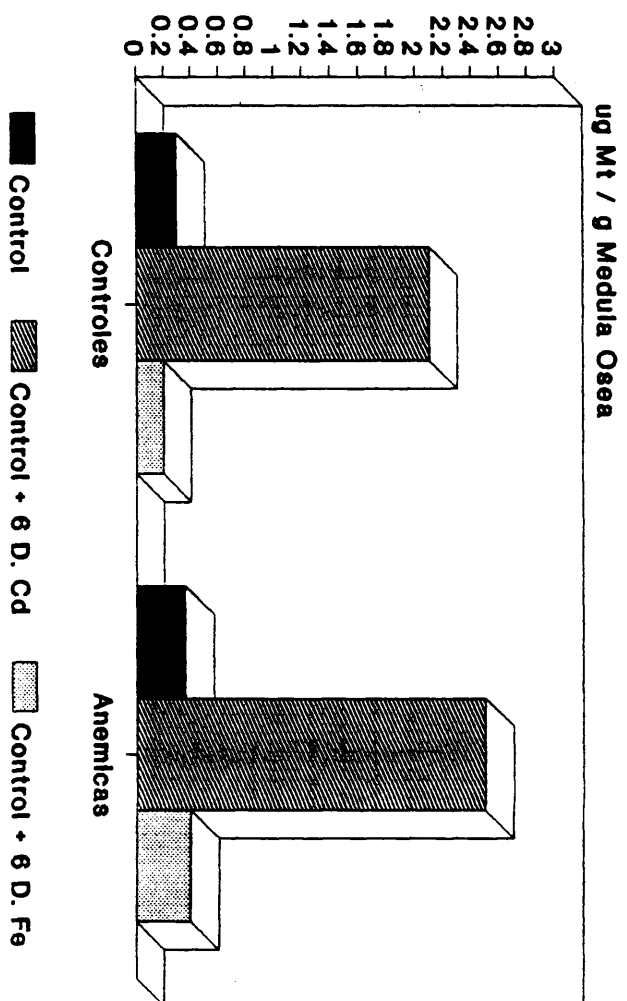
. E. A. A. : Valoración de Metalotioneina por saturación con Cd y posterior determinación del citado por Espectroscopia de Absorción Atómica .

Concentracion de Metalotioneina en Medula Osea



Zahler y Cleland Fig. 23

Concentracion de Metalotioneina en Medula Osea



E.A.A. (Espectroscopia Absorcion Atomica) Fig. 24

En las tablas 11 , 12, 13 y 18 ,19 ,20 se expresan las concentraciones de proteínas totales y Metalotioneina en los extractos de Cerebro , Mucosa Intestinal y Médula Osea , procedentes del aislamiento y purificación de la proteína motivo de estudio , en los distintos grupos de ratas .

A) Sobrenadante procedente de ultracentrifugación a 40.000 r.p.m. durante 60 minutos , de los homogenizados correspondientes a Cerebro , Mucosa Intestinal y Médula Osea de ratas control y anémicas , sometidas a diferentes tratamientos con tampón Tris-ClH 25 mM , pH 7.4 (p : v , 1 : 2)

B) Sobrenadante procedente de la ultracentrifugación a 40.000 r.p.m. durante 60 minutos , extracto procedente de tratamiento con calor a 80°C durante 5 minutos del sobrenadante recogido en el paso anterior .

En las figuras que se reseñan a continuación , se observa la diferencia de comportamiento cromatográfico referente a los distintos extractos motivo de estudio , en columna de Sephadex G - 50 calibrada previamente .

Las fracciones recogidas a partir de la elución a través de la citada columna , se procedió a determinar las concentraciones de Fe , Cd , Cu y Zn ; así como las absorbancias obtenidas a 254 nm y 280 nm

En la fig.25 contemplamos la calibración de la columna de Sephadex G - 50 con proteínas de peso molecular conocido :

- β - Lactoglobina (Mr = 18.400)
- Lisozima (Mr = 14.000)
- Ribonucleasa (Mr = 13.700)
- Citocromo C (Mr = 12.000)

Representando en el eje de abscisas , el peso molecular de las proteínas reseñadas y en el de ordenadas el coeficiente de reparto (Kr) de cada proteína .

Una vez obtenida la recta , extrapolamos el Kr experimentalmente encontrado de la proteína con Fe o Cd ,Cu o Zn, según el tratamiento recibido por los animales con dichos elementos , de tal modo se obtiene su peso molecular .

En la fig. 26 contemplamos el perfil cromatográfico en Sephadex G - 50 de un extracto de Cerebro de rata control .

Presenta 2 picos protéicos , de los cuales el de menor peso molecular presenta baja absorción a 280 nm .

En la fig. 27 la composición en metales al respecto.

En la fig 28 apreciamos el perfil cromatográfico a través de Sephadex G - 50 de un extracto de Mucosa Intestinal de rata control .

Se manifiestan 2 picos protéicos , el de menor peso molecular escasa absorción a 280 nm .

En la fig. 29 contemplamos su composición en metales.

En la fig. 30 observamos el perfil cromatográfico en Sephadex G - 50 de un extracto de Médula Osea de rata control .

Presentando 2 picos protéicos , con mínima absorción a 280 nm.

En la fig. 31 se contempla su correspondiente composición en metales .

En la fig. 32 se presenta el perfil obtenido de la elución a través de Sephadex G - 50 de un extracto de Cerebro , tratado con Cd intragastricamente , por sonda .

Dandose la particularidad de presentar mayor absorción a 254 nm el pico de menor peso molecular , con respecto al extracto control .

Estas fracciones asocian Cd , Cu y Zn , como podemos comprobar en la fig 33 .

Similarmente podemos observar en los casos referentes a Mucosa Intestinal fig 34 y 35 , asi como en Médula Osea fig 36 y 37 .

En las fig. 38 y 39 contemplamos el perfil cromatográfico a través de Sephadex G - 50 , de un extracto de Cerebro procedente de rata provista de anemia ferropénica .

Observamos el pico de mayor concentración es el que mayor absorción presenta a 254 nm , con presencia de Cd , Cu y Zn .

De igual modo podemos indicar para el caso de Mucosa Intestinal fig.40 y 41 .

En cambio estas indicaciones se presentan en Médula Osea , con una incidencia muy exigua , como podemos apreciar en las fig. 42 y 43 .

La representación de las Densidades Opticas determinadas a 220 nm por HPLC , se pueden contemplar en las figuras :

44 correspondiente al cromatograma de Metalotioneina patrón de conejo , a 220 nm de Densidad Optica .

Figura 45 , en las condiciones anteriormente indicadas , perfil correspondiente a Médula Osea Control , fig. 46 referente al perfil de Médula Osea tratada con 4 dosis de Cd y la fig. 47 corresponde al perfil de Médula Osea tratada con 6 dosis de Cd .

De igual modo se comprueban los perfiles correspondientes a los mismos tratamientos indicados , en Cerebro (fig. 48 control 49 tratado con 4 dosis de Cd y 50 con 6 dosis de Cd)

Asimismo en las fig. 51 correspondiente a Mucosa Intestinal control , fig. 52 del mismo tejido con tratamiento de 4 dosis de Cd y la 53 Mucosa Intestinal con 6 dosis de Cd .

Calibración de la columna de Sephadex G-50, empleada en el proceso de purificación

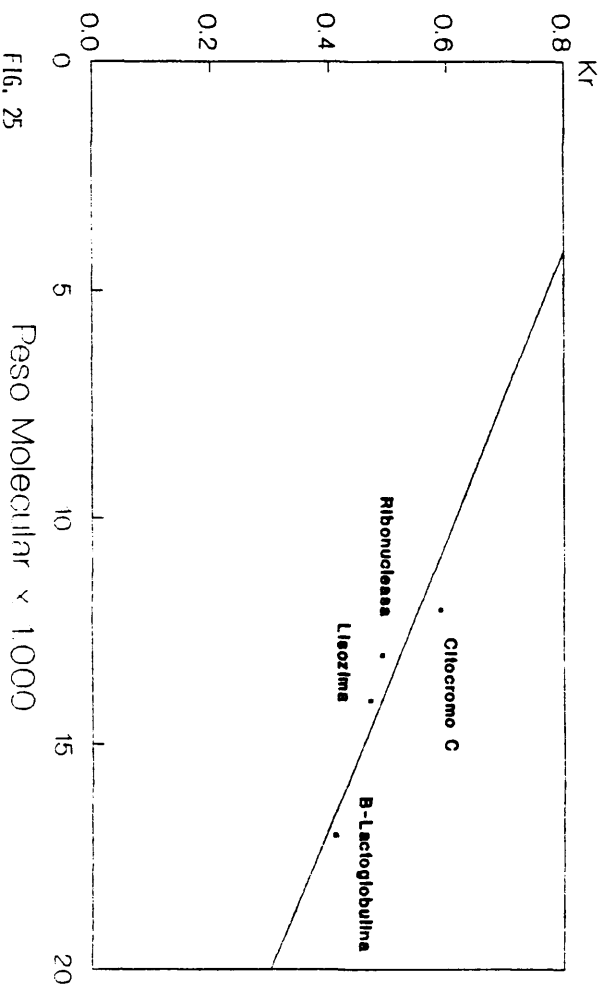


FIG. 25

D.O. de las fracciones eluidas a través
de Sephadex G - 50

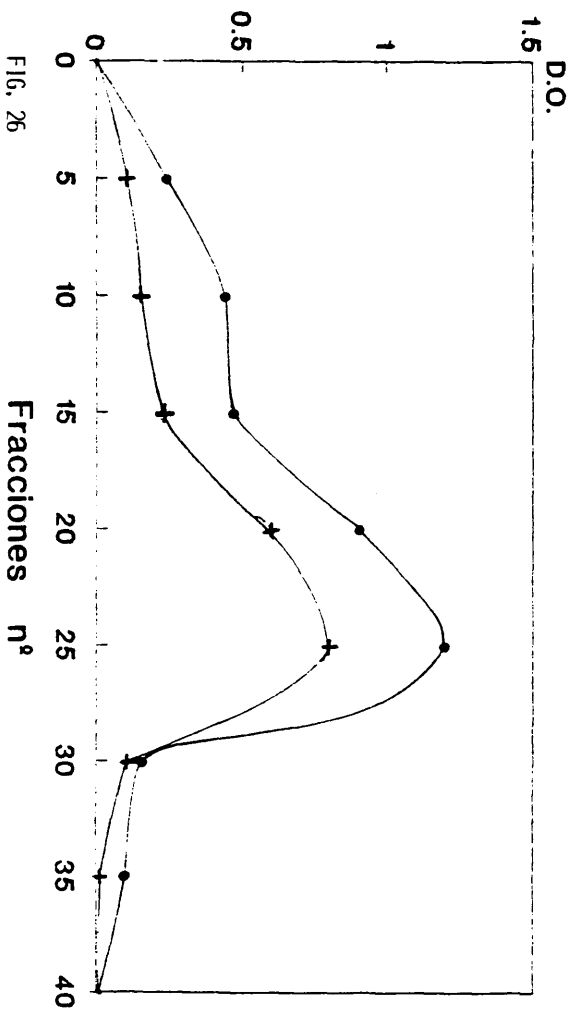
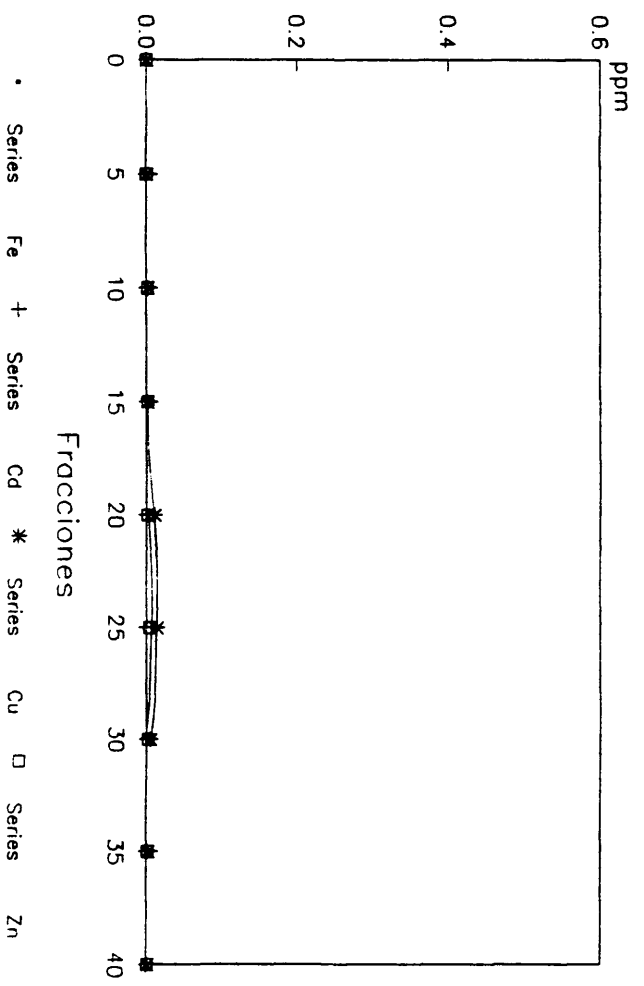


FIG. 26

• Series 254 nm + Series 280 nm

Cerebro Control

Contenido en metales de las fracciones eluidas a través de Sephadex G – 50



Cerebro Control
Fig. 27

D.O. de las fracciones eluidas a traves de Sephadex G - 50

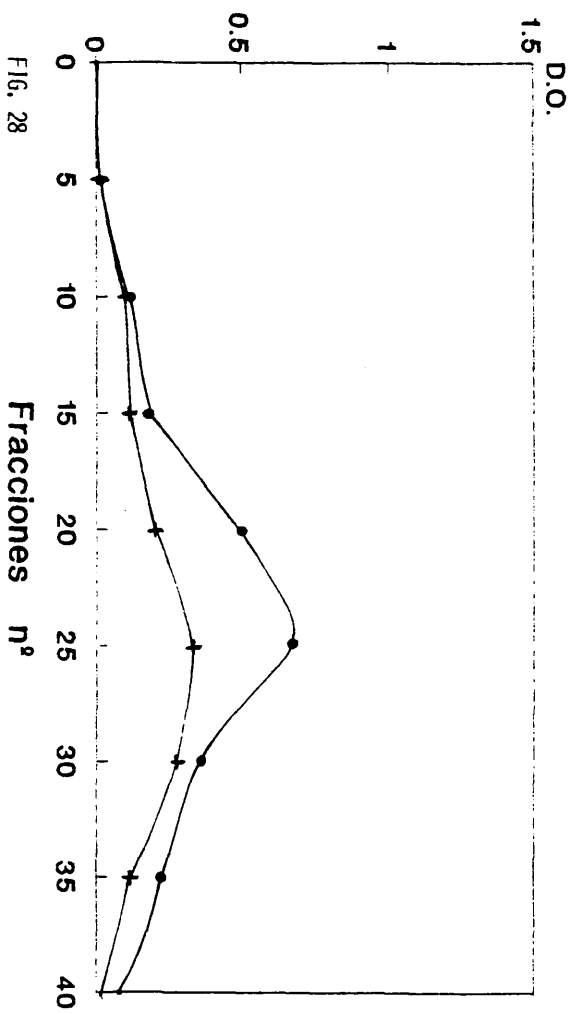
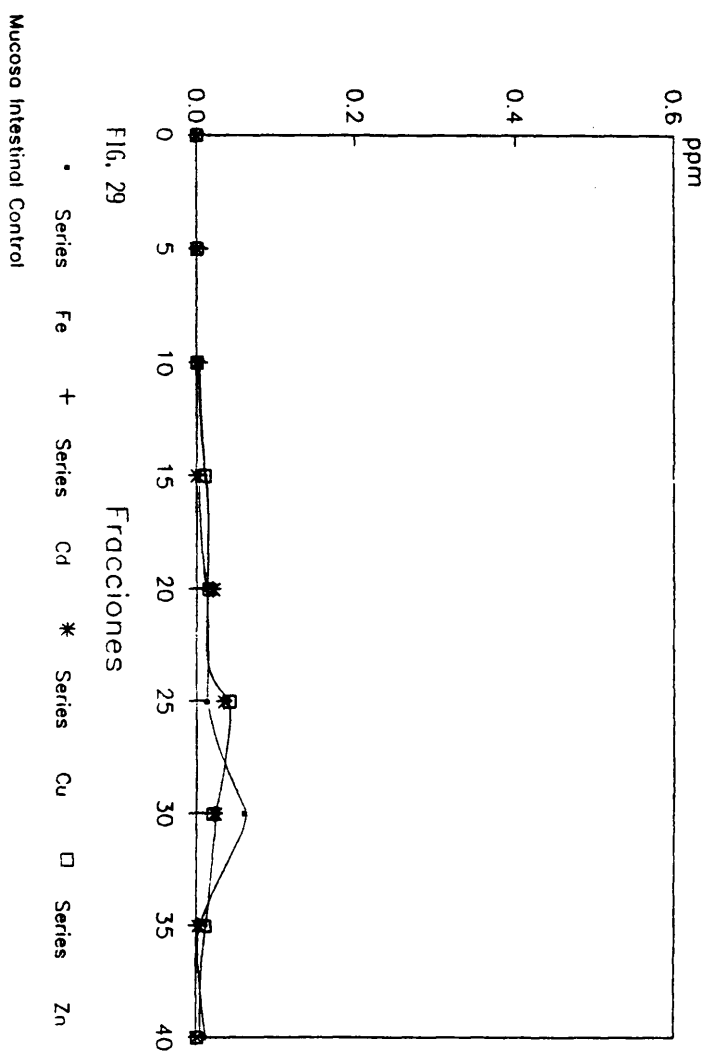


FIG. 28

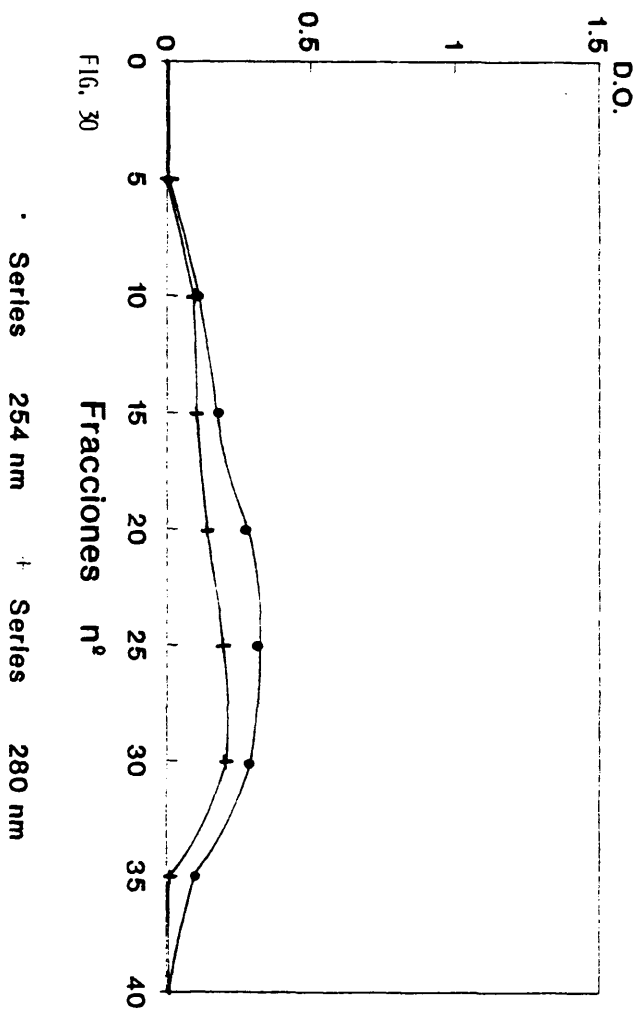
Series 254 nm Series 280 nm

Mucosa Intestinal Control

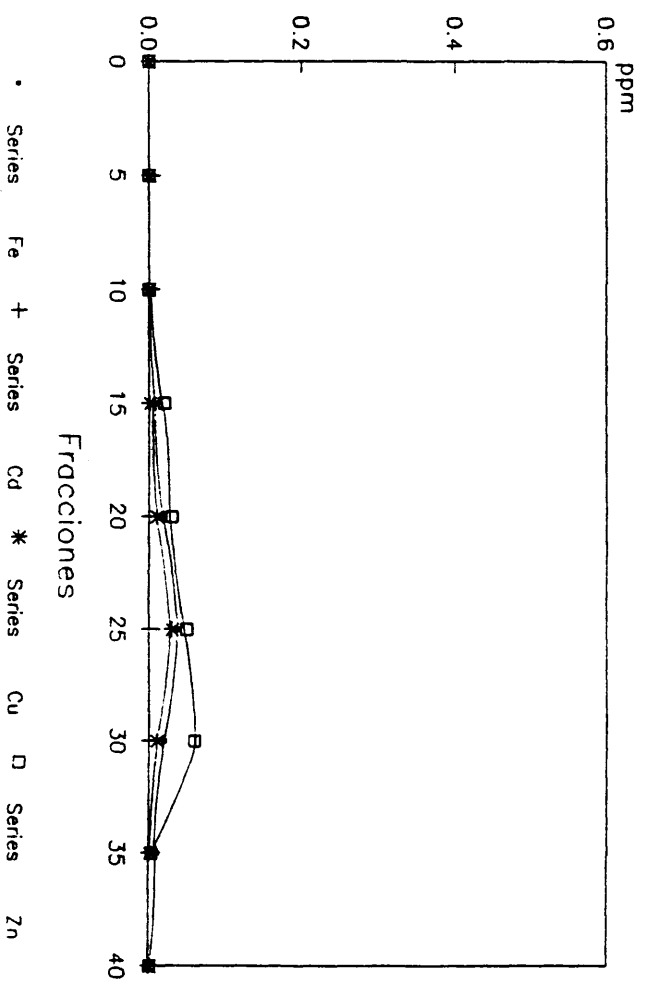
Contenido en metales de las fracciones
eluidas a través de Sephadex G – 50



D.O. de las fracciones eluidas a través de Sephadex G - 50



Contenido en metales de las fracciones eluidas a traves de Sephadex G - 50



Medula Oseo Control
Fig. 31

D.O. de las fracciones eluidas a traves de Sephadex G - 50

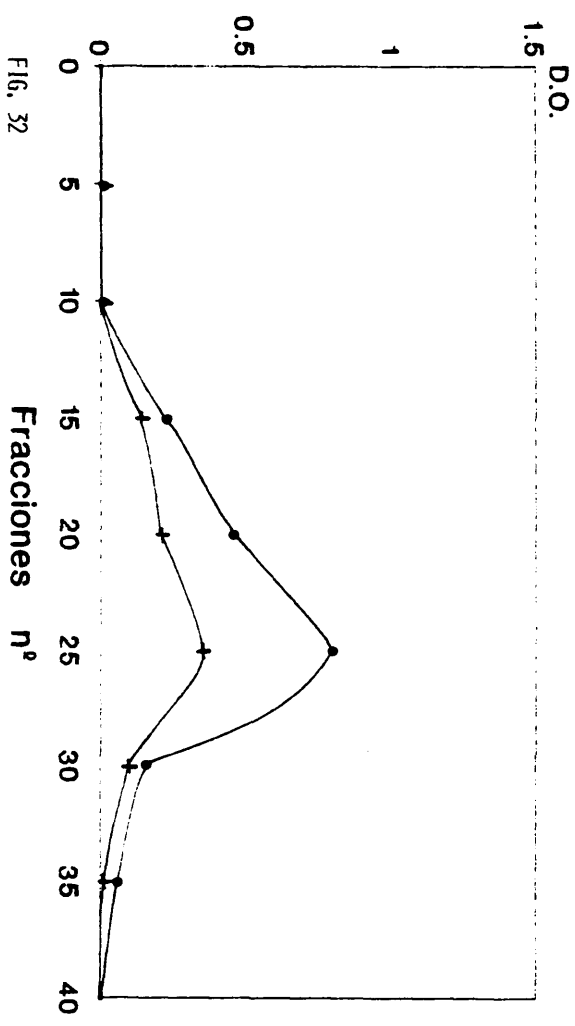


FIG. 32

• Series 254 nm † Series 280 nm

Cerebro tratado con Cd

Contenido en metales de las fracciones
eluidas a través de Sephadex G - 50

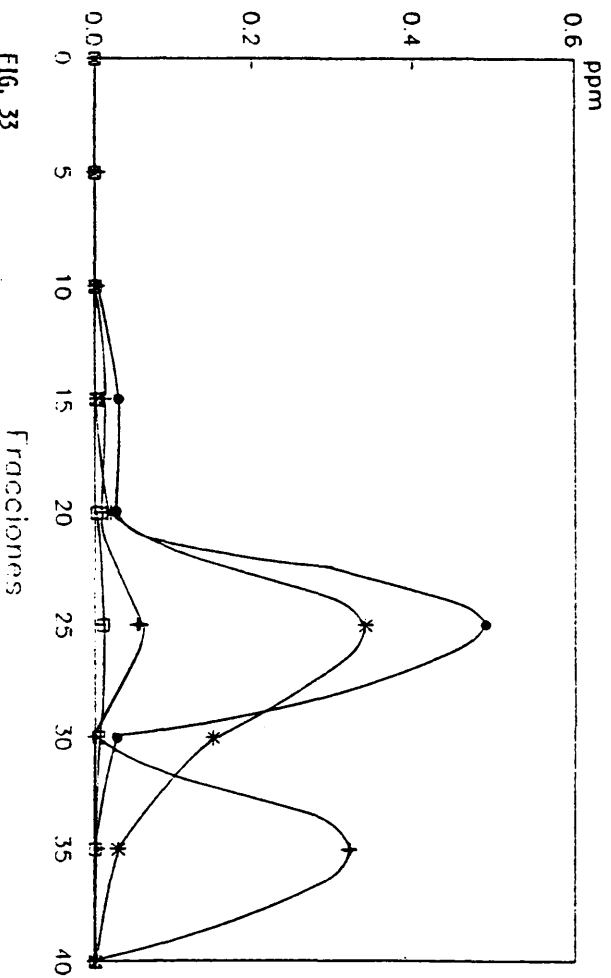


FIG. 33

● Series Fe + Series Cd * Series Cu □ Series Zn
Cerebro tratado con Cd

D.O. de las fracciones eluidas a traves
de Sephadex G - 50

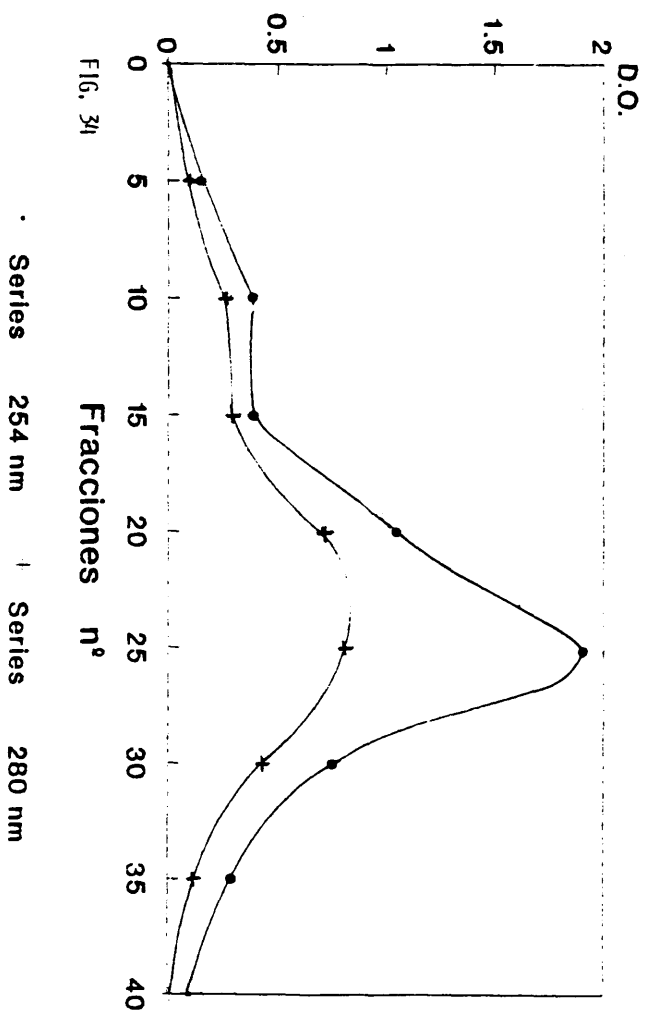


FIG. 34

Mucosa Intestinal tratada con Cd

Contenido de metales de las fracciones
eluidas a traves de Sephadex G - 50

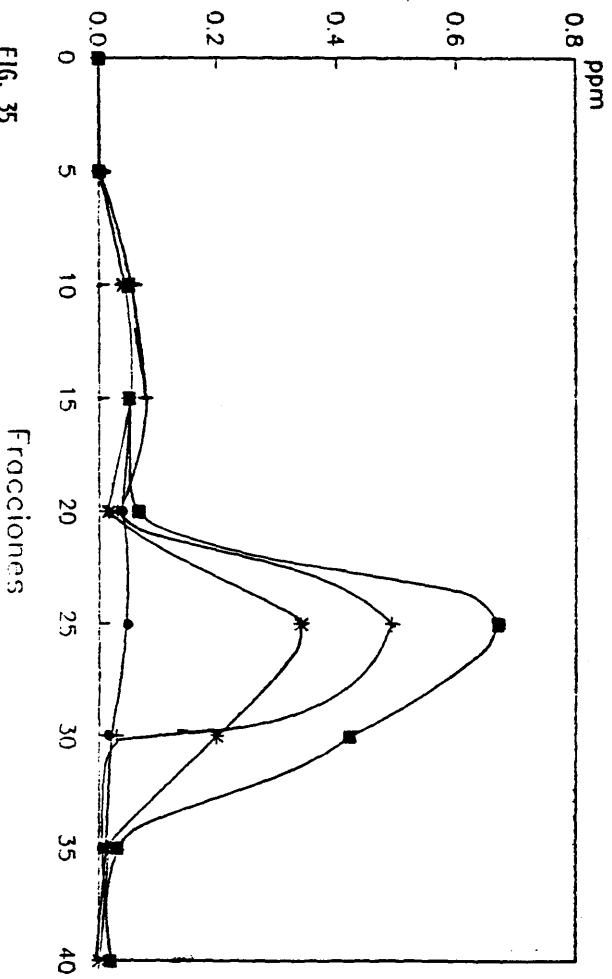
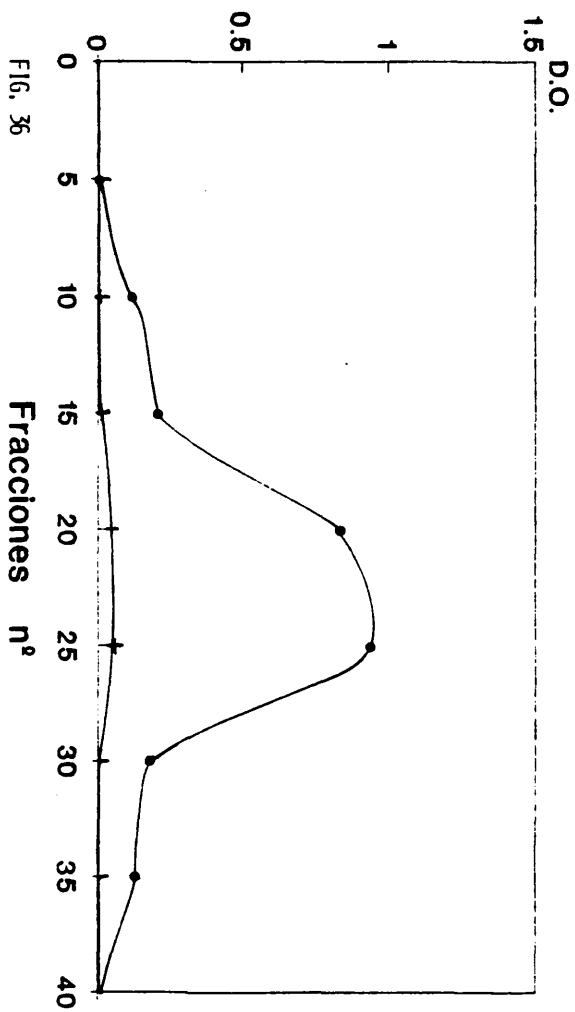


FIG. 35
 ● Series Fe + Series Cd * Series Cu □ Series Zn
 Mucoso Intestinal tratada con Cd

D.O. de las fracciones eluidas a traves
de Sephadex g - 50



Medula Osea tratada con Cd

Series 254 nm + Series 280 nm

Contenido en metales de las Fracciones
eluidas a traves de Sephadex G - 50

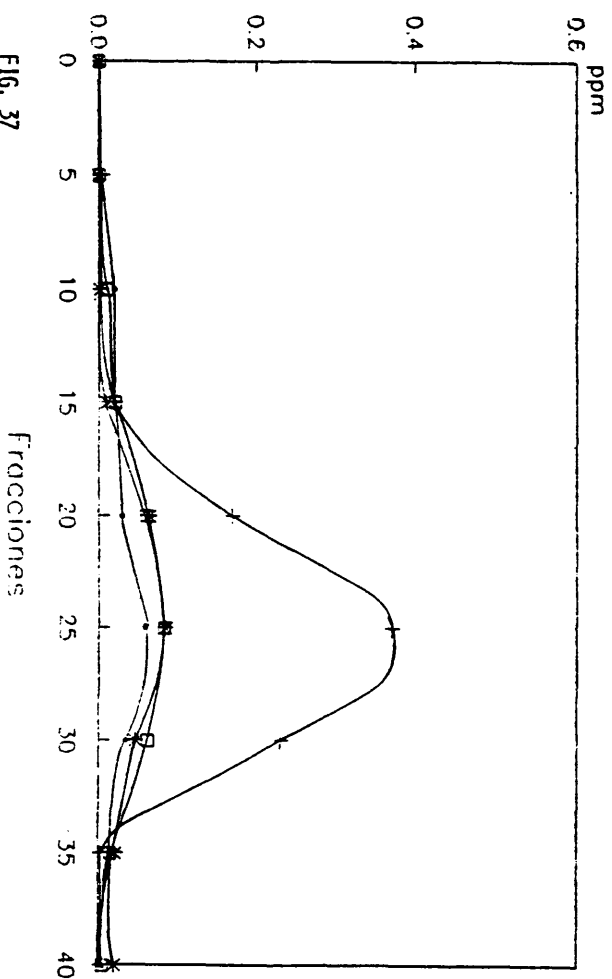
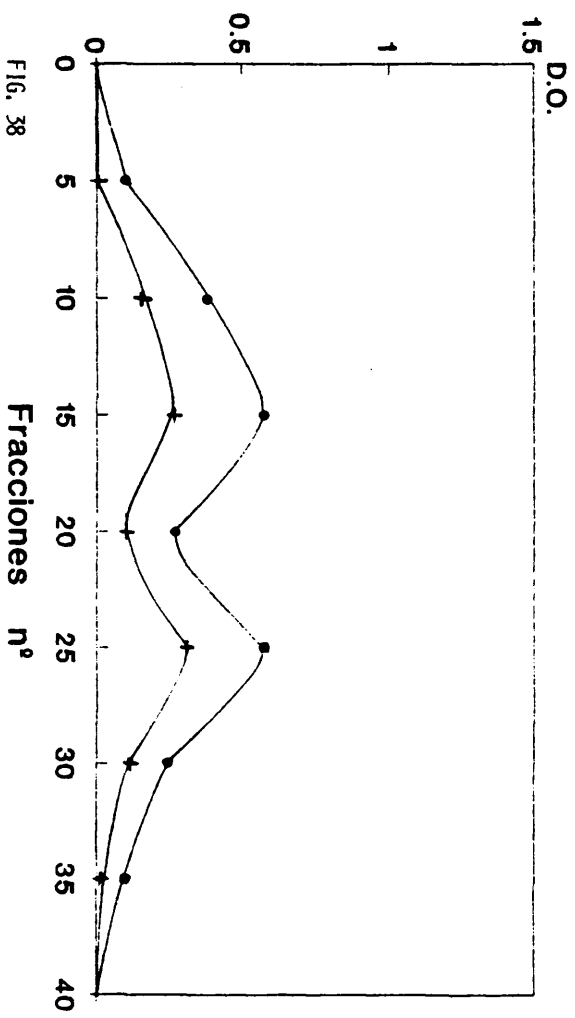


FIG. 37

• Series Fe + Series Cd * Series Cu □ Series Zn
Medulo Oseo tratado con Cd

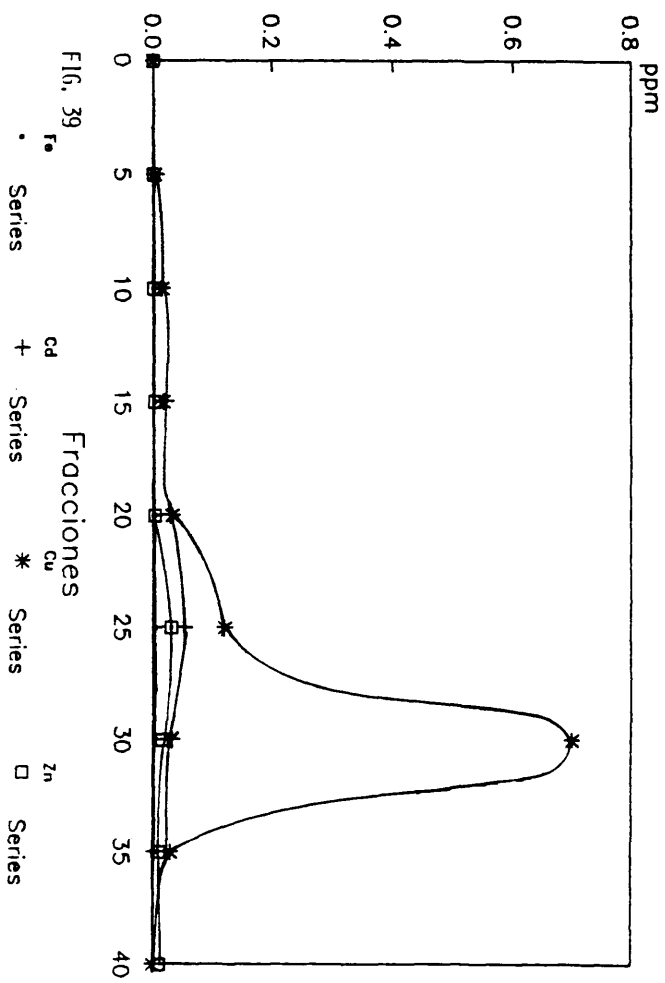
D.O. de las fracciones eluidas a traves de Sephadex G - 50



• Series 254 nm + Series 280 nm

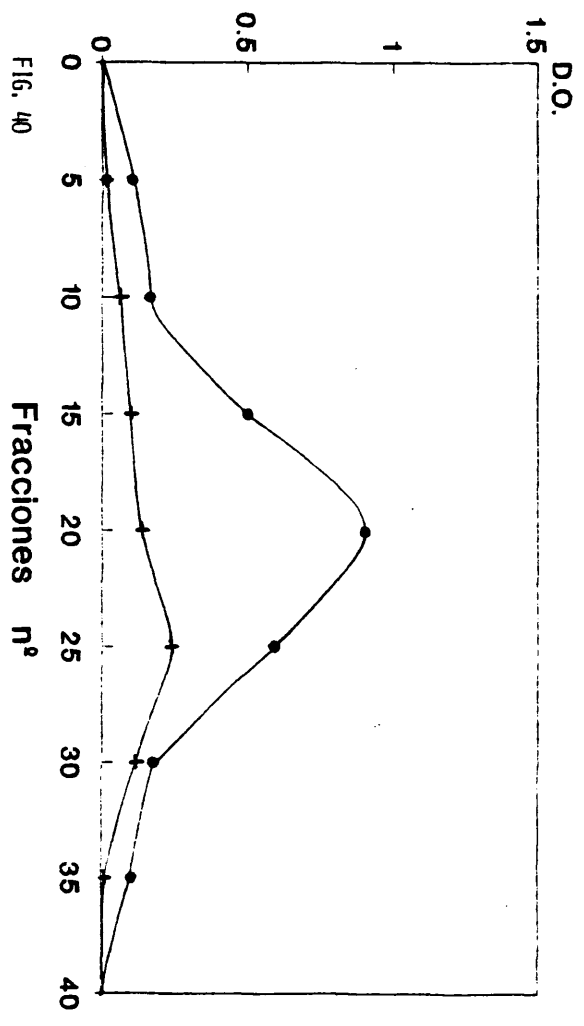
FIG. 38

Contenido en metales de las fracciones
eluidas a través de Sephadex G - 50



Cerebro Control Anemia

D.O. de las fracciones eluidas a traves
de Sephadex G- 50



• Series 254 nm + Series 280 nm

Mucosa Intestinal Control de Anemia

Contenido en metales de las fracciones
eluidas a través de Sephadex G - 50

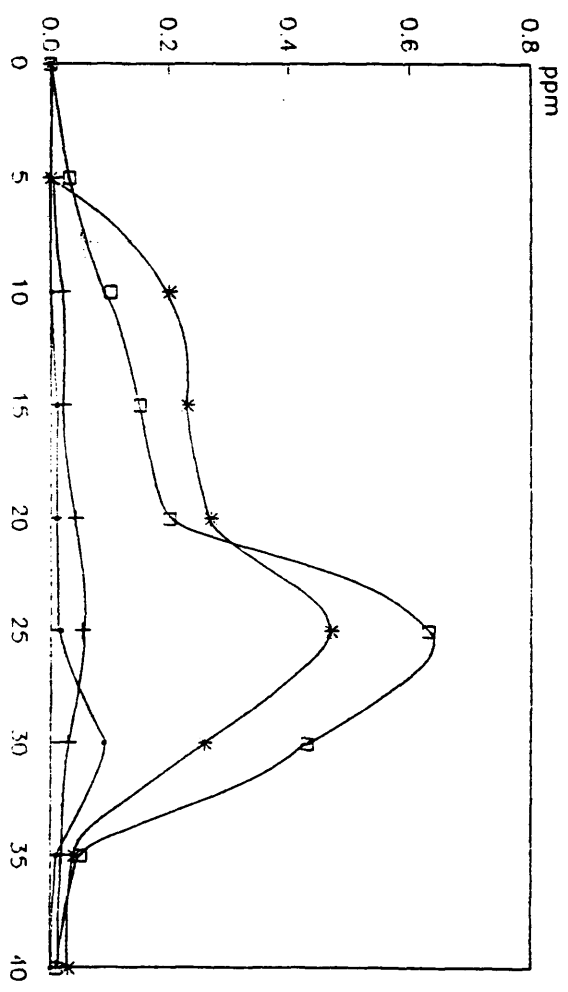
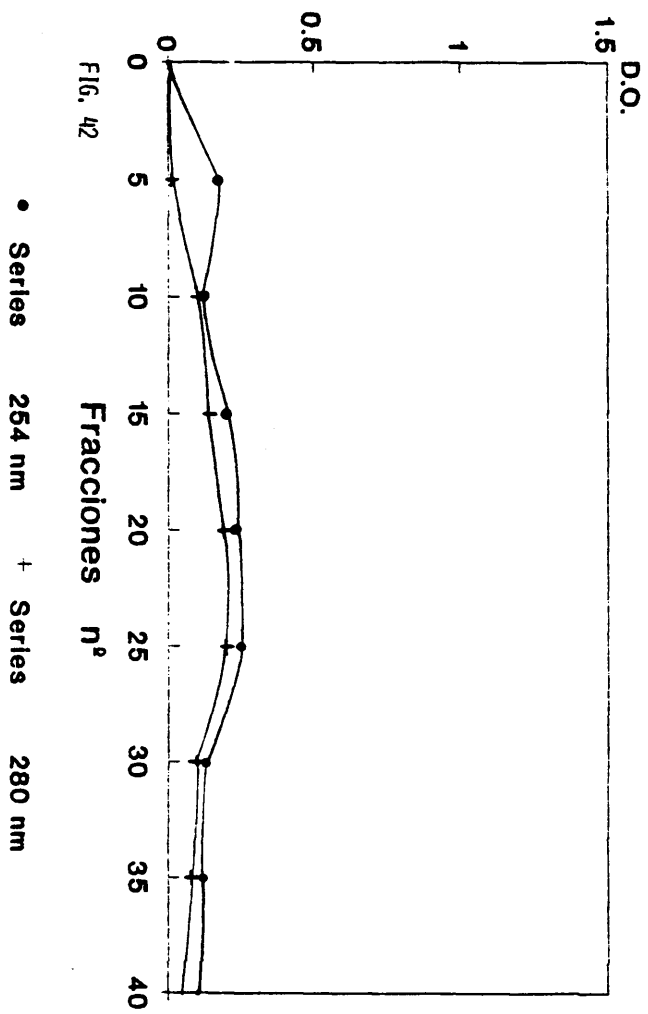


FIG. 41

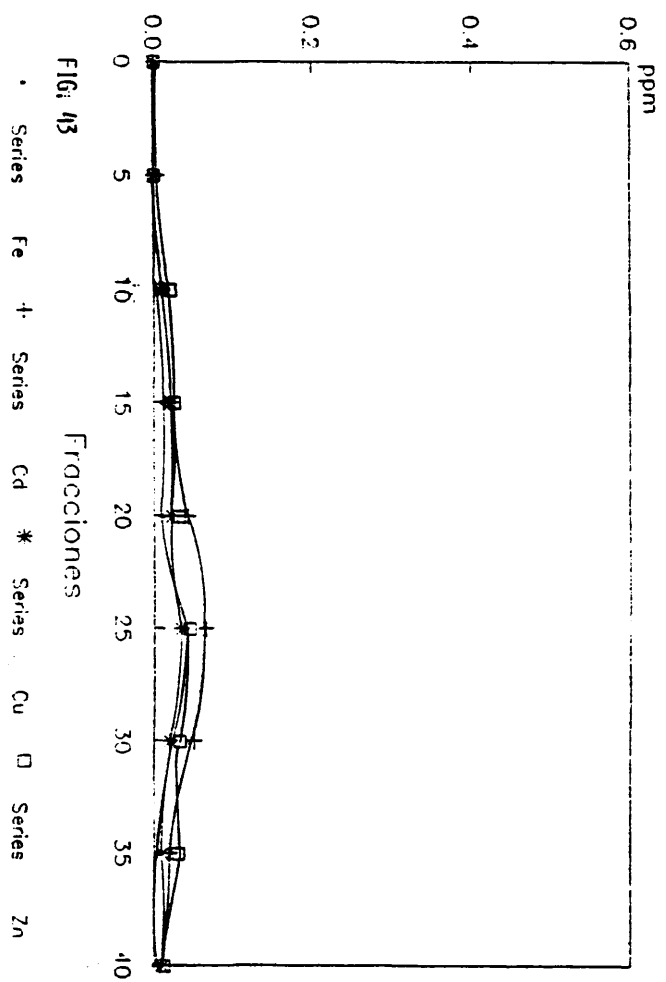
• Series Fe + Series Cd * Series Cu □ Series Zn
Mucoso Intestinal Control de Anemia

**D.O. de las fracciones eluidas a traves
de Sephadex G - 50**

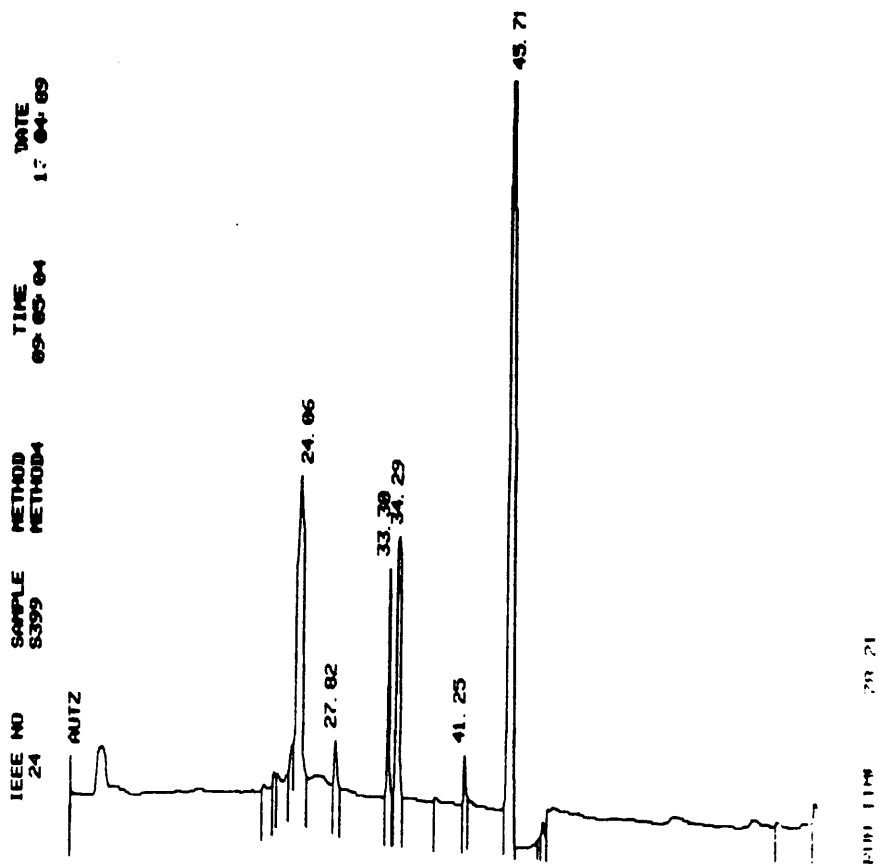


Medula Osea Control de Anemia

Contenido en metales de las fracciones
eluidas a traves de Sephadex G - 50



Medula Oseo Control de Anemia

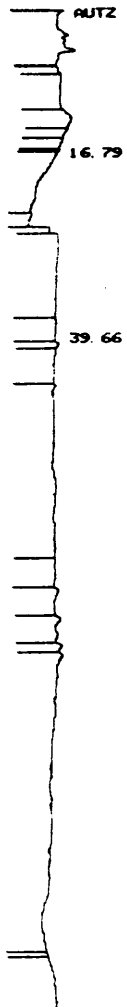


DEFAULT 0
 NORMALIZATION METHOD USING AREA

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
24.06	3082899	23.55963229	
27.82	222579	1.746287142	
33.38	896857	7.038865177	
34.29	1799886	14.11445395	
41.25	153936	1.207735848	
45.71	6671365	52.34158885	
TOTAL	12745842	99.99987446	

FIG. 44 METALOTIONEINA PATRON DE CONEJO

IEEB NO 24 SAMPLE 465 METHOD METHOD4 TIME 05-09-63 DATE 00-00-00



RUN TIME 120.00

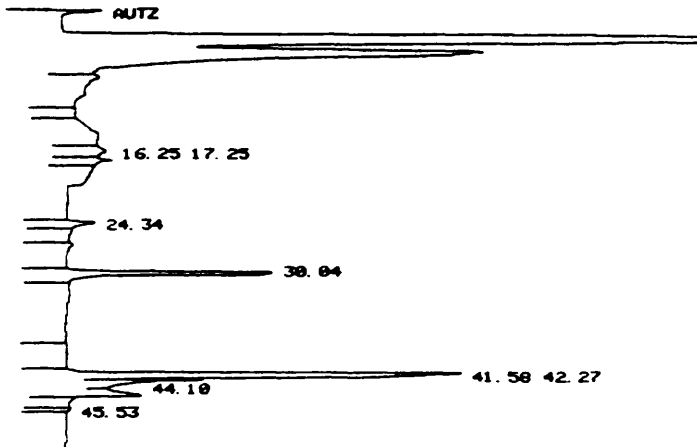
FIG. 45

MEDULA OSEA CONTROL

DEFAULT 0

NORMALIZATION	METHOD	USING AREA	AREA	PK NAME
TIME	AREA	%AREA		
16.79	2070	5.224238447		
39.66	37553	94.77323776		
TOTAL	39623	99.99747621		

IEEE NO 24 SAMPLE S472R1 METHOD METHOD4 TIME 06:25:36 DATE 00:00:00



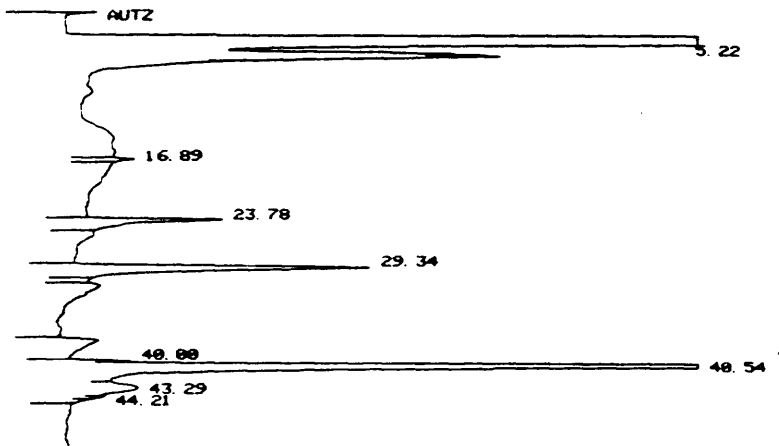
RUN TIME 50.00

FIG. 46 MEDULA OSEA CON 4 D. CADHIO
RECALC USING METHOD 4

DEFAULT 0
NORMALIZATION METHOD USING AREA

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
16.25	80016	1.049883042	
17.25	72863	0.859614403	
24.34	178822	2.028829167	
30.04	1633372	19.74588749	
41.58	5011604	59.77849109	
42.27	719693 SP	8.584732303	
44.10	639481 S	7.866389771	
45.53	7153	0.085347132	
TOTAL	8383410	99.99823460	

IEEE NO 24 SAMPLE S473 METHOD METHOD4 TIME 03:10:22 DATE 00:00:00



RUN TIME 49.99

FIG. 47 MEDULA OSEA 6 D. CADMIO

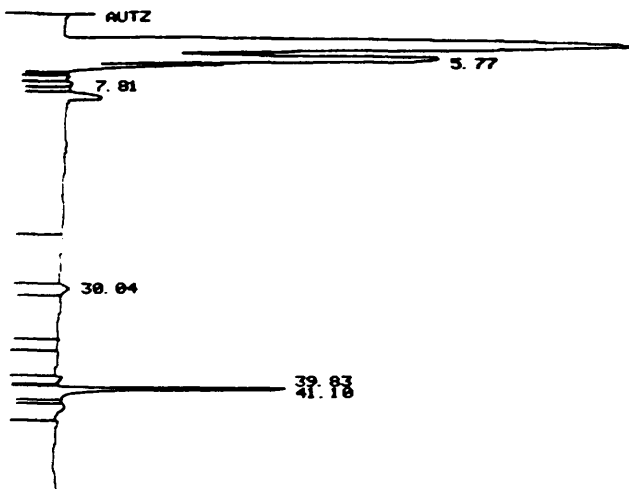
RECALC USING METHOD 4

DEFAULT 0

NORMALIZATION METHOD USING AREA

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
5.22	681532	4.056461040	
16.89	66743	0.397250051	
23.78	1189402	7.079456498	
29.34	3121870	18.58134572	
40.00	245860	1.463362981	P
40.54	10953334	65.19549451	
43.29	507833	3.022632378	SP
44.21	34179	0.203431358	S
TOTAL	16800753	99.99943454	

IEEE NO 24 SAMPLE 463 METHOD METHOD4 TIME 08:09:07 DATE 08:00:00

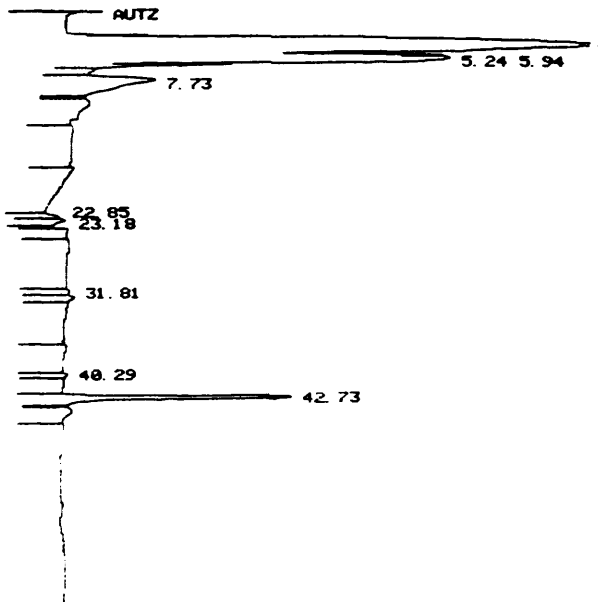


RUN TIME 52.44
 FIG. 48 CEREBRO CONTROL

DEFAULT 0
 NORMALIZATION METHOD USING AREA

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
5.77	462469	21.32818356	
7.81	21489	0.991827768	
30.04	86598	3.993625504	
39.83	44412	2.048188683	
41.18	1353387	71.63748555	
TOTAL	2168335	99.99843199	

IEEE NO 24 SAMPLE 455 METHOD METHOD4 TIME 04:24:09 DATE 00:00:00

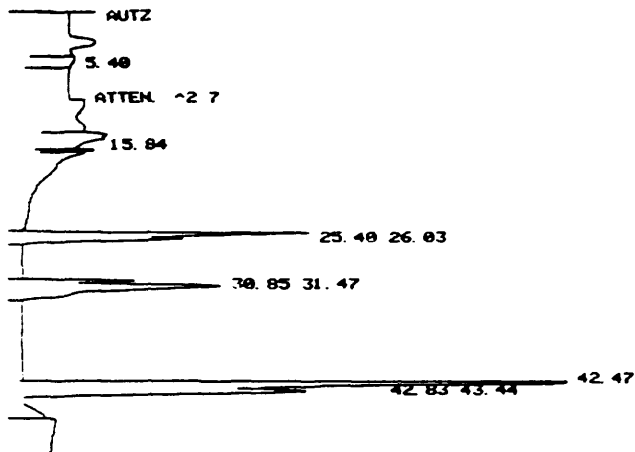


RUN TIME 65.44
 FIG. 49 CEREBRO 4 D. CADMIO

DEFAULT 0
 NORMALIZATION METHOD USING AREA:

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
5.24	575450	15.79341436	
5.94	266679	7.319296304	
7.73	1150936	31.58869506	
22.85	16062	0.440839125	
23.18	40923	1.123148967	
31.81	43352	1.189842970	
40.29	29589	0.565007503	
42.73	1529515	41.97833076	
TOTAL	3643506	99.99865514	

JEEB NO SAMPLE METHOD TIME DATE
 24 S436 METHOD4 15:51:03 23:05:09



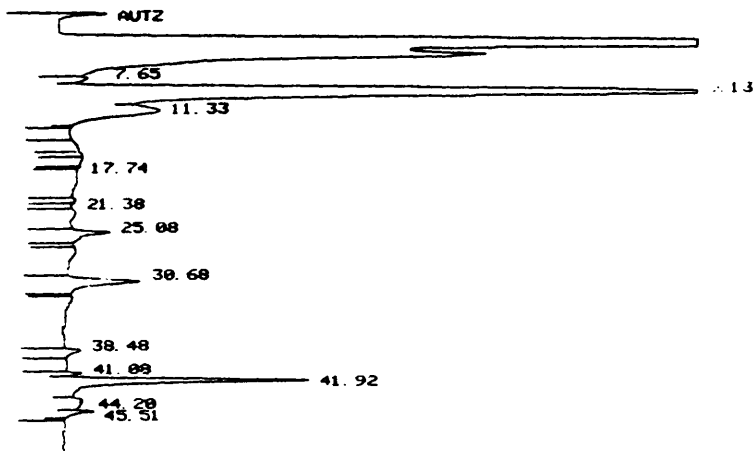
RUN TIME 50.56

FIG. 50 CEREBRO 6 D. CADHIO
 RECALC USING METHOD 4

DEFAULT 0

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
5.40	817707	4.98523833	
15.84	55104	0.329208292	
25.40	2317583	P 13.84595368	
26.03	1160789	6.934911522	
30.85	643353	P 3.943493678	
31.47	2894391	17.29198458	
42.47	4242322	P 25.34417542	
42.83	1692374	P 10.11076427	
43.44	2914716	17.41341240	
TOTAL	16738339	99.99913969	

IEEE NO 24 SAMPLE S473R1 METHOD METHOD4 TIME 03:16:25 DATE 00:00:00

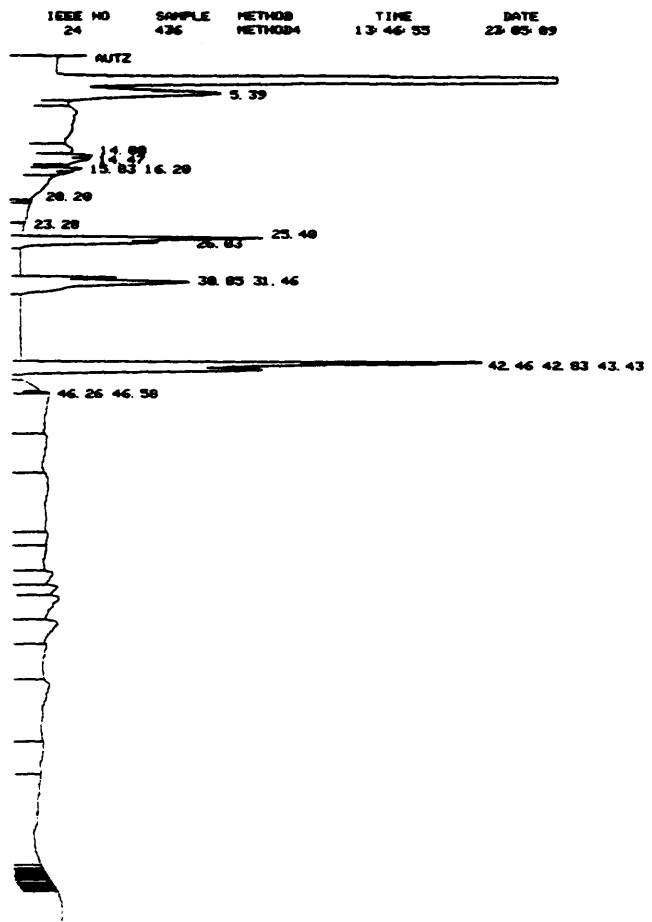


RUN TIME 50.11

FIG. 51 MUCOSA INTESTINAL CONTROL
RECALC USING METHOD 4

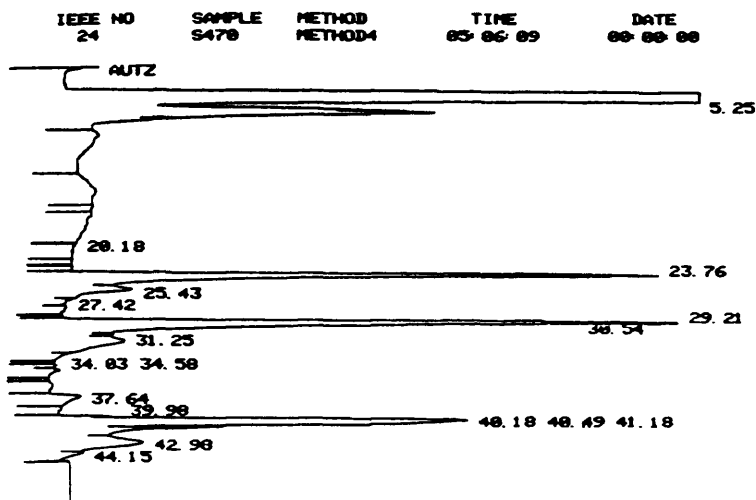
DEFAULT 0
NORMALIZATION METHOD USING AREA

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
7.65	155693	0.203735048	
9.13	56182066	73.52855438	
11.33	2982964 S	3.799214407	
17.74	11452	0.014987648	
21.38	73419	0.096003494	
25.08	1355021	1.773365190	
38.68	3424479	4.481636267	
38.48	542025	0.709367001	
41.08	347308 P	0.454324122	
41.92	9900346	13.06130620	
44.20	000060 SP	1.050063515	
45.51	625153 S	0.818160433	
TOTAL	76409506	99.99953932	



R. TIME 120.00
 FIG. 52 Mucosa Intestinal 4 D. CADMIO

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
5.39	817787	4.72859863	
14.87	187138	1.068341392	P
15.83	181814	1.049583827	P
16.20	118787	0.685741817	P
20.20	56849	0.331298668	
23.20	4694	0.027898324	
26.83	2285393	13.19312760	P
30.85	1216972	7.023337086	P
31.46	643414	3.714315857	P
42.46	2894512	16.78992061	P
42.83	4242322	24.49884336	P
43.43	1639841	9.577483278	P
46.26	2948849	17.01861845	P
	56225	0.324579264	
TOTAL	17322117	99.98284448	



RUN TIME 50.00

FIG. 53 MUCOSA INTESTINAL 6 D. CADMIO

RECALC USING METHOD 4

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
5.25	744082	2.853181866	
23.76	6579358	25.23872738	P
25.43	239578	0.918729583	S
27.42	39897	0.152997588	
29.21	8699481	33.36142485	
30.54	28427	0.078335716	SP
31.25	462288	1.772526382	S
34.03	11136	0.042783563	P
34.58	56472	0.216563864	
37.64	338687	1.298883646	
39.98	167883	0.648748347	P
40.18	291846	1.119283283	P
40.49	4852422	18.68811318	P
41.18	1492695	5.724331696	P
42.98	1881667	6.989231657	P
44.15	279365	1.071339765	
TOTAL	26876228	99.99898374	

V. DISCUSSION

V . DISCUSION :

La Metalotioneina , proteina motivo de estudio en este trabajo , está todavía por aclarar la función fisiológica específica (68 , 69) . Por las aportaciones de numerosos autores , sabemos que liga metales e indican la conexión de la citada proteina (48) con el metabolismo del hierro y su homeostasis , no debería descartarse , la participación de esta proteina de bajo peso molecular , en numerosos procesos de regulación en los que intervengan metales .

La posible función reguladora de la Metalotioneina puede cimentarse en los hechos siguientes :

La participación de la misma en el incremento de la actividad , mediante estímulo eléctrico en el conducto deferente de ratón , motiva un posible efecto sobre la membrana neuronal , así como en la sinapsis noradrenérgica. En concreto podría expresarse su intervención el aumento de liberación presináptica de noradrenalina , o bien por un incremento de la permeabilidad de la membrana post sináptica para el Calcio (117 , 108) . Estos y otros hechos experimentales nos inclinan a pensar , en considerar esta proteina como reguladora del metabolismo , y no específicamente como propia de un metal determinado .

En este trabajo tratamos de aportar datos , sobre la participación de la Metalotioneina en el metabolismo y la homeostasis del Hierro .La elección de anemia ferropénica para llevar a cabo nuestro estudio , se debe a los siguientes datos :

a)- La Absorción del Cd a nivel intestinal , aumenta en animales deficientes de Fe .

b)-La administración de Cd en animales de experimentación , induce estado de anemia hipocrómica o microcítica .

c)-Los trabajos publicados de nuestro grupo de investigación , establecieron que la Metalotioneina se incrementa en duodeno , de ratas con anemia posthemorrágica .En ratas con anemia ferropénica y posthemorrágica la citada proteína se halla asimismo incrementada en mucosa duodenal y en cerebro en la homeostasis del hierro .

La Metalotioneina , proteína de bajo peso molecular con elevado contenido de restos de cisteína en su molécula (30 %) , asocia elevado n° de átomos de Cd que ingresan en el organismo , así como el aumento significativo en la concentración de esta proteína en riñón e hígado , tejidos mas selectivos de acumulo para la citada proteína .

Actualmente se ha comprobado "in vivo" la asociación de la molécula de Metalotioneina con iones Fe , no obstante en estudios "in vitro" , su estructura contiene principalmente iones diamagnéticos Zn (II) y / o Cd (II) y en condiciones adecuadas origina complejos paramagnéticos Fe (II).(48)

Los datos anteriormente expuestos nos han orientado en la posible participación , en el metabolismo intracelular del Fe de la Metalotioneina y de su proyección en la regulación homeostática a nivel de cerebro .

Actualmente se considera que la absorción del Fe , está regulada por las células de la Mucosa Intestinal (49 , 27 , 48) , nos han facilitado sugerencias para aportar datos en el estudio y aislamiento de esta proteína en " Cerebro Mucosa Intestinal y Médula Osea" , así como su relación con la "Anemia" . Como modelo experimental hemos elegido la anemia ferropénica , inducida por dieta deficiente en hierro ; y la rata por su facilidad de manejo , para tratar de dilucidar su mecanismo de absorción y homeostasis .

El estado anémico en ratas , se produjo mediante extracción de sangre por punción cardíaca , dos veces semanales , así como administración de dieta deficiente en Fe . Según se ha descrito en material y métodos .

La combinación de ambos procesos , se debe a lograr nuestro objetivo en un periodo de tiempo mas factible , ya que suministrando unicamente dieta , se alargaria demasiado el mismo y los resultados obtenidos son similares .

Fué seleccionado el sistema de punción cardíaca , por resultar el menos lesivo para los animales , proporcionando excelentes resultados , manteniendo el estado general del lote en experimentación y baja tasa de mortalidad en la población . Otros métodos probados y desechados han sido : Extracción de sangre por vena de la cola , arteria de la retina e implantación de cánula en la yugular .

Para supervisar el estado anémico , consideramos los parámetros intimamente relacionados con el mismo : Hemoglobina , hematocrito , proteinemia , hierro sérico , capacidad total y libre de fijación de hierro en suero .

Hemos hecho mas hincapié en las variaciones de hierro sérico y hemoglobina , de vital importancia en anemia hipocrómica .

La evolución de los resultados , sigue el curso normal a medida que se implanta el estado anémico , como podemos comprobar en el apartado de resultados .

El grupo de animales destinado a recibir dieta deficiente en Fe , sufre una perdida de peso con respecto al grupo de control , estadísticamente significativo a partir de día 11 .

Tales diferencias pueden estar motivadas por la dinámica de adaptación de los animales a la nueva alimentación .

Respecto al consumo de agua en los citados grupos , percibimos una notoria diferencia entre los animales en proceso anémico y control , siendo mas elevado en aquellos con el fin de restablecer la volemia .

Finalizado el proceso de implantación del estado anémico , procedimos a la inducción de la biosíntesis de Metalotioneína con Cd en los animales Control y Anémicos .

Con la aplicación de distintas dosis de Cd , elemento inductor de la citada proteína . (109) , nos hemos inclinado por la sexta dosis utilizada .

En principio el Cd , inhibe la absorción del Fe a nivel de Mucosa Intestinal , produce anemia en animales de laboratorio (135) y en humanos (48) , así como sus efectos tóxicos son muy conocidos . (118)

Otros investigadores han estudiado el proceso anémico y observado que esta condición fisiopatológica incrementa la absorción del Cd , Fe y otros metales en ratones (54 , 141) y en humanos (41) . Por ello consideramos la utilidad del estado anémico en esta investigación , que por las condiciones fisiológicas y de regulación homeostática del animal , se hallan aumentadas las concentraciones en reacciones implicadas en este síndrome .

En los resultados se puede apreciar que la administración de Cadmio , como elemento marcador de proteínas con grupos tiólicos (- SH) como la metalotioneína , induce a una mayor incorporación de este metal en mucosa intestinal de ratas anémicas , con respecto a los animales control .

Del mismo modo la médula ósea y cerebro de los animales sometidos a anemia ferropénica , acumulan mayor concentración de Cd , que los mismos tejidos de los animales control . Estos datos nos llevan a sugerir , que tratándose del marcaje de la metalotioneína por el Cadmio , esta proteína podría hallarse aumentada simultáneamente en los mismos tejidos .

En todos los casos la acumulación de Cd es superior en Mucosa Intestinal que en Médula ósea y Cerebro .

Paralelamente los resultados obtenidos utilizando el radionucleido Fe - 59 , nos indican de igual manera , superior incorporación del isótopo en Mucosa Intestinal , Cerebro y Médula osea de ratas anémicas que en las control .

Es decir , que tanto el Cd como el Fe-59 nos han sido de enorme utilidad y eficacia en el marcaje de proteínas con grupos -SH (tiólicos) , asociándose con enlaces mercáptidos , intimamente relacionados con el estado anémico .

Los datos discutidos viene corroborados por la determinación de la Metalotioneina , en los mismos tejidos donde se determino cadmio , observándose un incremento de sus concentraciones en los animales anémicos desde el inicio del tratamiento con Cd , de forma mas acusada que en los animales control , donde solo se detecta en cantidades apreciables la metalotioneina nativa en Mucosa Intestinal , sin embargo , en Meédula Osea y Cerebro la sensibilidad de nuestra técnica , o la reducida cantidad de tejido utilizada , impide su detección .

Un hecho interesante , puesto de manifiesto en este trabajo es que a medida que se agrava la condición anémica de la rata , se incrementa paulatinamente la concentración de metalotioneina en Mucosa Intestinal y Cerebro ; sin embargo en Médula Osea el incremento no es tan significativo , respecto a animales control .

Tanto en el tratamiento con Cd como en el estado de anemia ferropénica , se observan concentraciones superiores de metalotioneinas respecto a animales control . Es decir , la metalotioneina es inducida tanto durante el tratamiento con Cd, como durante la agravación del estado anémico del animal .

Segun Webb y Verschoyle , estos hechos tienen la interpretación siguiente , las dosis iniciales del citado elemento en animales de experimentación , pone en marcha los mecanismos de inducción de esta proteína . Una vez en acción , se procede a secuestrar el metal , siguiendo la homeostasis su curso normal .La metalotioneina queda acumulada en el organismo o tejido , o es liberada y se dirige a otros tejidos donde realiza su función biológica , aún desconocida .

Nuestro estudio se centraliza en 6 dosis de Cd de 1 mg Cd / kg rata / día , tanto en animales en proceso anémico como para los controles ; puesto que nos va a proporcionar los niveles idoneos de la proteína , para estudiarla mejor en sus facetas Bioquímica , Toxicológica y Patológica .

Basándonos en estas circunstancias , optamos por emplear las mismas dosis de Fe , para poder establecer variaciones respecto a la síntesis de metaloproteína en relación con este metal , tanto en ratas control como anémicas y en los mismos organos .

En efecto los valores de Hematocrito y Hemoglobina , durante el proceso de tratamiento de las ratas anémicas con este elemento , los parámetros fisiológicos tienden hacia valores normales , mientras que , en los controles no se observan variaciones .

Por el contrario , con el Cd se agudiza el proceso anémico , con disminución de las concentraciones de Hematocrito y Hemoglobina , en ambos grupos de animales , control y anémico , esto se debe a la característica propia del Cd de producir anemia en animales de laboratorio por competitividad con el hierro , impidiendo su absorción y transporte . Ampliamente descrito por numerosos autores . (58 , 135)

En este trabajo se refleja también , que en la anemia ferropénica de la rata , hay un aumento de las proteínas totales respecto a las de las ratas control . Sin embargo las diferencias no son estadísticamente significativas .

Su incremento es paralelo al de la metalotioneína , y este hecho acaece mas acusado , en animales anémicos con posterior tratamiento de Cd .

La Metalotioneína , posee un comportamiento muy similar a la Transferrina , hecho que nos inclina a pensar , en una posibilidad de participación fisiológica de aquella proteína en el transporte de Hierro o transporte dentro de la célula mucosal y su liberación al borde opuesto , es decir a la sangre .

Esto resulta de gran interés , considerando que hasta la actualidad , la transferrina ha sido considerada como proteína de transporte de hierro , desde las superficies absorbivas a la Médula Osea , quedando incorporado a la fracción hemo de la molécula de Hemoglobina , dándose esta circunstancia tanto en el hombre como en un porcentaje elevado de animales . El descenso de la metalotioneína en la Mucosa Intestinal después de la administración de hierro estable , tanto si se determinan sus grupos tiólicos , con Cd y absorción atómica , como con el Ac. 5,5' - ditio bis -2 - nitrobenzoico , sugiere que la metalotioneína es una proteína de transporte de hierro .

En la literatura clásica , se han descrito dos proteínas que unen hierro , relacionadas con su absorción , en diversas especies de animales . Una de las cuales se ocupa del almacenaje de hierro en tejidos , conocida por Isoferritina .(89 , 104 , 61 , 158) . Relacionada directamente con los almacenes corporales de Fe e inversamente con la absorción de Fe .

La segunda proteína es la Transferrina , (52 , 62 . 142 , 35 , 110) , variando sus concentraciones en sangre y Mucosa Intestinal durante el transcurso de absorción e incorporación de hierro y depósitos orgánicos del mismo .

Edwards y Hoke (34) detallan la presencia de tres proteínas que unen hierro , en mucosa duodenal de ratones con anemia ferropénica .

De estas proteínas , dos son similares a Ferritina y Transferrina , en cuanto a los niveles de las mismas en relación a ratones normales , concluyeron que los mecanismos en el interior de la mucosa , respecto al transporte de hierro suceden satisfactoriamente , con a la deficiencia de hierro del animal .

La tercera proteína , no estudiada por los autores reseñados , presentaba un peso molecular de 10.000 daltons , muy comparable con la Metalotioneina , motivo de estudio en el presente trabajo y cuya identidad podría ser la misma .

Los métodos de estudio para la determinación de la Metalotioneina , en los distintos experimentos llevados a cabo (161 , 101) consistente en saturación con cadmio y determinación del mismo por Espectroscopia de Absorción Atómica la consideramos mas aconsejable , por su exactitud .

Este elemento , se suele unir totalmente y saturar a la Metalotioneina , representandola a su vez , por su elevada proporción de grupos - SH que captan el metal y forman grupos mercáptidos estables .

A concentraciones bajas de esta proteína , se obtienen resultados concordantes , con los proporcionados mediante la técnica de Zahler y Cleland .

Para la purificación de la proteína , motivo de nuestro trabajo , se somete a la acción del calor durante 5 minutos a 85 °C , dada la propiedad de la metalotioneina , de permanecer estable frente al calor .

Varios autores han basado el aislamiento y purificación , de la metalotioneina , apoyados en la termoestabilidad de la misma .

Así observamos que Shaikh , Smith (126 , 128) describen el procedimiento de homogenización del tejido , calentando a 85°C por espacio de 10 minutos , posteriormente su separación mediante Sephadex G - 75 . Utilizan , estos autores , una disolución extractiva amortiguadora y centrifugan a velocidad superior (128)

Chang y cols. (20) Someten a 80 °C durante 1 minuto , centrifugan y proceden a la separación por Sephadex G - 75 y DEAE - Celulosa , en gradiente Tris - ClH . y asimismo Cherian y cols. (21) proceden a homogenizar tejido hepático con Tris - ClH , 0.1 M pH 8.6 , centrifugando a 10.000 r.p.m. por espacio de 15 minutos , el sobrenadante obtenido lo someten a 80°C 2 minutos , acto seguido proceden a centrifugar de nuevo a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos .

Webb (148) indica que la Cd-Metalotioneina , permanece estable frente al calor , considerando su purificación mediante un paso que incluya desnaturalización por calor (85 °C , 10 minutos) . Por este procedimiento podrían eliminar un 90 % de las proteínas totales y a continuación eluir a través de Sephadex , aislando la Cd-Metalotioneina

En consonancia con estos datos acabados de mencionar los resultados obtenidos por nosotros muestran un rendimiento , unas 10 veces superior , en las proteínas con cadmio procedentes de extractos de Mucosa Intestinal , de ratas tratadas con este elemento , y utilizan el calor como medio de purificación ante la termoestabilidad de nuestra proteína , frente a los resultados de los extractos control .

Se conoce (10) que las concentraciones relativas de Cd / Zn son 1.4 veces superior , en extractos de hígado sometidos a calentamiento , respecto a los obtenidos no siguiendo este sistema .

Estos hechos sustentan , la existencia en la fracción citosólica de células hepáticas , de Zn - proteínas con resistencia térmica , en determinadas condiciones operativas .

Segun Webb (148) en volúmenes elevados de extractos de higado , son separadas por dialisis , las proteínas de alta masa molecular relativa , sin pérdida de Cd ; el proceso tiene lugar durante 18 horas a 4 °C , en volumen similar de disolución saturada de sulfato amónico a pH 7.2 ; se centrifuga y el sobrenadante , se somete a dialisis durante 24 horas , y se efectuan 3 cambios de disolución amortiguadora 20 mM de fosfato a pH 7.4 .

Numerosos autores , utilizan la Cromatografía de exclusión molecular , mediante columna de Sephadex , con el fin de aislar y determinar el peso molecular de la Metalotioneina .

Entre los mismos podemos citar los siguientes :

Sephadex G - 50 (153 , 115 , 64)

Sephadex G - 75 (97 , 147 , 25 , 74 , 19 , 83 ,
133 , 108 , 113 , 119 , 136 , 139 ,
112 , 147)

En el sistema utilizado en este trabajo , con Sephadex G - 50 , la elución se verifica con el mismo tampón utilizado en la homogenización , no presentandose diferencias significativas , con los resultados obtenidos por los autores anteriormente reseñados .

Durante el transcurso del presente trabajo , la metalotioneina de " Cerebro , Mucosa Intestinal y Médula Osea de rata , con un peso molecular inferior a 10.000 daltons , presenta las características propias de las Metalotioneinas purificadas y aisladas en otros tejidos , dichas son : Absorción a 253 nm a pH 7.4 (no absorbe a 280 nm , puesto que esta proteína no posee aminoácidos aromáticos ; unión a metales propios de las Metalotioneinas ; bajo peso molecular y elevado contenido de grupos tiólicos (-SH) .

Es este trabajo , se corrobora que los extractos de metalotioneina tienen hierro , siendo su concentración superior, en los animales anémicos tratados con hierro , que en los controles y por ende la metalotioneina acopla hierro , como elemento nativo propio de la misma .

Estos resultados aseveran nuestra opinión , que la metalotioneina es una proteína que participa en el metabolismo del hierro , podría participar en el transporte del hierro , como la transferrina , desde la célula de la Mucosa Intestinal hasta la sangre , cerebelo y médula osea .

El nuevo concepto que introducimos en esta tesis , consiste en la consideración de la metalotioneina como proteína de transporte de hierro , con función equivalente a la transferrina sin embargo , sus propiedades , parecen reunir mayores características específicas , para el transporte del hierro que las inherentes a la transferrina . Estas son , menor masa molecular relativa , mayor facilidad para el transporte y difusión a través de los poros tisulares , mayor efectividad de carga férrica en el transporte .

La afinidad y lábilidad para el hierro de la metalotioneina le confiere a esta proteína otra característica primordial , como se observa experimentalmente . En efecto los extractos procedentes de ratas anémicas , sometidas a tratamiento con cadmio , la metalotioneina alcanza su máximo de acumulación mucosal , al quedar esta bloqueada por el cadmio , sin embargo la administración de hierro exógeno induce a la pérdida del cadmio y el retorno a los niveles de metalotioneina de los animales control , difundiendo así , esta proteína desde el epitelio intestinal hacia sangre y tejidos . Los experimentos de metalotioneina Fe - 59 y los respectivos radionucleidos y tejidos principalmente Médula Osea . Cerebro , Hígado y Bazo (órganos hematopoyéticos) , será el objeto de estudio posterior a esta tesis .

En extractos procedentes de ratas anémicas , sometidos a tratamiento con Cd , la concentración de Metalotioneina adquiere su cenit , retornando a los niveles obtenidos en ratas control , en el caso de administración exógena de Fe .

Basándonos en la propiedad típica de la Metalotioneina , de su tendencia a la oxidación , en condiciones aeróbicas (94) originando de este modo agregados e incluso desplazamientos de sus picos hacia fracciones correspondientes a moléculas de mayor peso molecular , se procedió a desgasificar el tampón empleado en la homogenización y en la elución de la columna de Sephadex G - 50 , manteniéndolo a borboteo con Nitrógeno de forma continua , en cámara fría a 4 °C .

Los experimentos realizados con ratas anémicas y control a las que se le administró el radionucleido Fe - 59 , por vía intracerebro ventricular , demuestran asimismo , la mayor incorporación del isótopo en las regiones cerebrales , mucosa intestinal y médula ósea , de los animales anémicos respecto a los controles .

Estos datos corroboran los anteriores en otros tejidos y por sonda intragástrica . Estos resultados , afianzan y aseveran , nuestra hipótesis , sobre la participación cerebral en el metabolismo y homeostasis del hierro .

La ubicación del metal , en la columna de Sephadex G - 50 , se establece por Espectroscopia de Absorción Atómica , proporcionándonos el pico del metal Cd o Fe , que ha sido inyectado en la rata , control o anémica . Además se determinan cobre y Zinc , que a pesar de no ser inyectados , aparecen espontáneamente unidos en cierta proporción , en la molécula de metalotioneina .

Es interesante los niveles de Cu , Zn y Fe en ratas anémicas administradas con cadmio . Así en cerebro , se observa en orden decreciente Fe > Cu > Cd > Zn (este no significativo) .

En médula ósea Cd > Zn = Cu > Fe (este no significativo), en mucosa intestinal Zn > Cd > Cu > Fe (este elemento no significativo) . En Cerebro , podemos aseverar que la metalotioneina tiene en mayor proporción Fe , Cu y Cd , según queda señalado , pero la concentración relativa de Zinc es despreciable . En Médula Osea , el cadmio administrado ocupa mayoritariamente los enlaces mercáptidos en la metalotioneina , mientras que el Zinc y Cobre por igual tiene una reducida distribución y el hierro es despreciable . Mientras que en Mucosa Intestinal , la metalotioneina , despues de la administración de cadmio en la rata anémica , aparenta tener mayor concentración relativa de Zinc , luego de Cadmio y posteriormente de Cobre , y no es significativa la concentración de hierro . Esto no contradice , los resultados anteriormente expuestos , sobre el interés de la metalotioneina en la anemia , sino que lo justifica , porque en la rata anémica , la metalotioneina con hierro emigrara de inmediato desde la Mucosa Intestinal , hacia la sangre y organos sistémicos , inducido precisamente por la homeostásis del sttus del animal anémico . Sin embargo , en Cerebro protegido por la barrera hematoencefálica , del acceso de cadmio , tendrá mayor concentración de metalotioneina con hierro .

La Médula Osea , sin embargo explica asimismo , por su acusada acumulación de cadmio , no solo el agravamiento de la anemia por el citado elemento , sino la inducción de la anemia por este metal , puesto que tiene selectividad de acumulación en este tejido y afinidad de acumulación en la metalotioneina , pues como se sabe , sus uniones con esta proteina son mas fuertes y estables . Por consiguiente las concentraciones relativas , de zinc y cobre en la Mt , son muy bajas y las de hierro no significativas .

Para afianzar los resultados obtenidos en esta tesis y considerar la calidad de los mismos , hemos utilizado la Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC) , que permite cuantificar y separar las múltiples formas de la metalotioneína . Se ha aplicado la técnica seguida por Hunziker y Kägi (64) , que utilizan para hígado humano , y separan 6 isometalotioneínas . Estos autores, señalan que la rata solo tiene dos isometalotioneínas , el cerdo siete y el conejo seis isoformas .

En las ratas anémicas , se encuentra por consiguiente , una superior acumulación de los metales estudiados , mientras que en los control , las concentraciones son acusadamente más bajas . Estos metales constituyen , en este trabajo , el índice de metalotioneína , tratándose del pico en Sephadex G - 50 , correspondiente a pesos moleculares , propios de la metalotioneína , cuya altura se eleva acusadamente , cuando se induce esta proteína . Estos datos son corroborados , mediante la aplicación del sistema HPLC , para el estudio de las isoformas de la metalotioneína.

En las ratas tratadas con cadmio , el pico en el que se ubica este elemento , se inyecta en el sistema HPLC , su elución registra unos picos que caracterizamos y cuantificamos , por sus tiempos de retención , altura y registro cuantitativo con sus porcentajes relativos .

La aplicación de HPLC , a los extractos semipurificados donde se ubica el cadmio , de los experimentos en ratas control y anémicas , observamos que en las condiciones de trabajo , no se detectan picos de metalotioneína en los animales control . Sin embargo , los extractos procedentes de animales anémicos denotan la existencia de 5 isometalotioneínas , respecto al perfil de animales control . Estos picos corresponden , a la región de los obtenidos con el extracto control de la metalotioneína de hígado de conejo , inducida con cadmio de sigma .

Se observa , que a cuatro dosis de cadmio aparecen 5 picos de metalotioneina , en Médula Osea , y los picos 1, 2 y 3 son los que se incrementan en los animales , al pasar de cuatro dosis a seis dosis de cadmio .

En Cerebro , en las mismas condiciones y dilución que en la médula ósea , aparecen 6 picos de metalotioneinas , en el control aparecen las isoformas 4 y 5 ; mientras que , en los extractos de Cerebro tratados con 6 dosis de cadmio , se manifiestan 6 isoformas , siendo mas acusados las formas 1, 4 , 5 y 6 . Con cuatro dosis de cadmio , por via intragástrica , se hace patente un perfil similar al control , lo que indica que el paso de cadmio al cerebro es demorado por la barrera hematoencefalica ., y no ha alcanzado la inducción de las isoformas de la metalotioneina . Se demuestra , por este experimento , la existencia clara y rotunda de las isoformas de metalotioneina en Cerebro y el cadmio alcanza a partir del cuarto día el cerebro , con la consiguiente inducción de todas las isoformas de metalotioneina

En Mucosa Intestinal control , se manifiesta debilmente las isometlotioneinas 2 , 4 y 5 ; mientras que al aplicar cadmio , a los animales anémicos , hay una marcada inducción de biosíntesis de isometalotioneinas , muy acusada probablemente por la condición anémica del animal .

Al aplicar 4 dosis de cadmio , el perfil de isometalotioneinas , pasa de tres picos , en el control , a 7 picos . Las isometalotioneinas identificadas con claridad , respecto al patrón propuesto en nuestro estudio , son 1, 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , y 7 .

Con seis dosis de cadmio por via intragástrica , a ratas anémicas , se manifiestan también 7 picos de isometalotioneinas . De ellas , aumentan con respecto al incremento de la dosis de cadmio , la número 1 destaca de la 2 , la 3 destaca de la 4 , ambas 1 y 3 destacan asimismo de la 5 .

Despues de estos datos , podriamos sugerir , que las isometalotioneinas 1 y 3 , podrian ser consideradas en la rata , como posibles marcadores de la intoxicación con cadmio , por via oral . Pero desconocemos si estas moleculas que se encuentran en sangre , a una baja concentración , podrian ser utilizadas como diagnostico de intoxicación o exposición a metales .

Estos resultados demuestran , que en la anemia ferropénica de la rata , hay un incremento de isometalotioneinas , en Mucosa Intestinal , Médula Osea y Cerebro . En todos los casos existe la presencia de hierro , zinc y cobre en la metalotioneina , de los animales anémicos .

La metalotioneina , parece participar , en el mecanismo de absorción , transporte e incorporación del hierro y creemos tambien , del zinc y del cobre , en los mamiferos .

las diferencias de concentración de zinc , cobre y hierro , en Médula Osea , Cerebro y Mucosa Intestinal , creemos viene dada por la presencia del cadmio y por la fisiopatologia del status anémico . En el Cerebro , la presencia de la barrera hematoencefalica impedira o retrasara , por una parte la presencia del cadmio en la molecula de metalotioneina , y por otra la afinidad y selectividad del hierro por la metalotioneina y el cerebro .

En Mucosa Intestinal , la presencia directa del cadmio por su ingestión oral decidiria su acumulo a asociación a la metalotioneina . Por otra parte , el cadmio , como es conocido , impedira por competitividad con el hierro , su presencia en este tejido . Además la presencia exógena del hierro , por ingestión vuelve a la normalidad los niveles de Mt , en Mucosa Intestinal , la rápida difusión y transporte de la metalotioneina con hierro elemento plástico y necesaria su presencia , en los organos sistémicos del animal anémico , serian causa de los bajos niveles de hierro y de metalotioneina en mucosa intestinal , de la rata anémica , recién administrada de dosis exógenas de hierro .

Finalmente , en las ratas anémicas con 4 y 6 dosis de cadmio se halla en médula , un nivel mayoritario de cadmio , frente a zinc y cobre , unidos todos a metalotioneina . El número de isoformas de metalotioneina se simplifica , a 1, 3 ,5 con la 6 y 7 en pequeña proporción . Esto podría representar que el cadmio tiene mayor especificidad , por las isoformas 1 , 3, y 5. por otra parte , al no ser significativos los porcentajes relativos de zinc y cobre , hay menos heterogeneidad de metalotioneinas o uniformidad , en las especies moleculares , ocupados sus grupos tiolicos en mayor proporción , por cadmio . Este hecho explicaría , el acusado efecto del cadmio en agravar la anemia y el inducir este elemento el status de anemia ferropénica no solamente por competitividad , con el hierro a nivel de la mucosa intestinal.

VI - RESUMEN Y CONCLUSIONES

VI.- RESUMEN :

El presente trabajo , muestra la purificación y detecta la Metalotioneina , en Cerebro , Mucosa Intestinal y Médula Osea de animales , concretamente , ratas en estado anémico y control ; estableciendo las analogías y diferencias presentes en los tejidos reseñados .

La Metalotioneina es una proteína de bajo peso molecular , no dispone de aminoácidos aromáticos , contiene en su molecula , un porcentaje considerable de residuos de Cisteina , es factible su inducción por administración de Cd , así como otros elementos

Se desconoce actualmente su función biológica , aunque es probable su participación , en la homeostasis y regulación del metabolismo de metales esenciales como Cu y Zn .

Estos hechos , junto con la absorción incrementada de Cd en animales deficientes de Fe , así como la inducción en animales de experimentación de anemia hipocrómica , por establecerse una competitividad entre aquel elemento y el Fe .

Nos condujeron al estudio de la Metalotioneina en Cerebro , Mucosa Intestinal y Médula Osea , relacionado con los estados de anemia ferropénica en rata .

El proceso de purificación de la citada proteína , en los tejidos indicados , de ratas control y anémicas mediante administración de Fe y Cd por sonda intragástrica , con el siguiente protocolo : Homogenización , sonicación , ultracentrifugación , precipitación de proteínas por acción del calor , cromatografía de Sephadex G - 50 , y cromatografía líquida de alta presión .

Los resultados obtenidos nos conducen a obtener las siguientes conclusiones :

- 1 - Incremento de metalotioneina , en ratas anémicas .
- 2 - El estado anémico eleva la concentración de Metalotioneina en Cerebro , Mucosa Intestinal y Médula Osea de ratas tratadas con cadmio .
- 3 - La Metalotioneina , sigue un comportamiento muy similar a la Transferrina en estados de anemia ferropénica .
- 4 - La Metalotioneina asocia en su estructura molecular Fe , así como otros elementos tales como : Cu , Cd y Zn .
- 5 - La administración de Cd eleva la concentración de Metalotioneina en Cerebro , Mucosa Intestinal y Médula Osea de rata , por la capacidad de aquel para inducir anemia y establecer una competitividad con el Fe .
- 6 - La Metalotioneina de Cerebro , Mucosa Intestinal y Médula Osea de rata , esta intimamente relacionada con los estados de anemia ferropénica , proponiendo la participación de dicha proteína en el metabolismo del hierro , en los niveles enumerados , así como en la homeostasis férrica .
- 7 - En HPLC , se corrobora el aumento de metalotioneina en Cerebro , Mucosa Intestinal y Médula Osea , de ratas anémicas .

VII .- BIBLIOGRAFIA

VII - BIBLIOGRAFIA :

1. AISEN P , Transferrin metabolism and the liver , Semin .
liver Dis , 1.984 ; 4 ; 193 - 206 .
2. AISEN , P. : Ed . G. L. Eichhorn. Elsevier Sc. Pub. Co.,
Amsterdam , 280 , 1.975 .
3. ANAND , B.S.; CALLENDER , S.T. , SKINNER , J.: J. Br.
Haematol., 33 , 609 , 1.976 .
4. ANDERSEN , R.D.; WINTER , W.P. ; MAHER , J.J. and BERSTEIN
I.A.: Biochem. J., 174 , 327 , 1.978 .
5. BACON Br., TAVILL As , Role of liver in normal metabolism
Semin , Liver , Dis , 1.984 ; 4 ; 181 - 192 .
6. BAKER E., VICARY Fr., HUEHNS Er. Iron release from
isolated hepatocytes . Br, J. Haematol. 1.981 , 47 , 493-
- 504 .
7. BATLE M., OLMOS A., ENRIQUEZ DE SALAMANCA R., MUÑOZ J.J.,
PRENSA A., CAMPO I. Niveles de Ferritina sérica en
individuos normales . N. Arch. Fac. Med. 1.984 ; 42 ; 465-
- 469 .
- 7.bis. BERLIN M. and FRIBERG L. : Arch. Env. Health. , 1.
478 , 1.960 .
8. BERSTEIN I.A. : Biochem. J. , 174 ; 327 ; 1.978 .
9. BLANC B. and ISLIKER H. : Helv. Physiol. Pharmacol. Acta
23 , 145 , 1.965
10. BONDIA S. : Tesis Doctoral . Fac. Farmacia . Univ.
Complutense . Madrid , 1.982 .

11. BONDIA S. ; RIBAS B. ; DE LA TORRE A.M. and SANTOS RUIZ ;
A Proceeding 28 th Intern. Congress. Physiol. Sci. , 12.
Nutrition , Digestion , Metabolism. (T. Gati. L.G.G.
Szollar , Gy. Ungvary . Edts.) Pergamon Press Akademiai
Kiado , 71 , 1.980 .

12. BONDIA S. ; RIBAS B. ; DE LA TORRE A. M. and SANTOS
RUIZ A. Adv. Physiol. Sci. Pergamon Press. T. Gati L.
G. Szollar Gy. Ungvary (eds.) 12 , 71 , 1.981 .

13. BOTHWELL Th. , CHARLTON R.W. , MOTULSKY Ag. Idiopathic
hemochromatosis , Stanbury J.B. et al. Ed. En : The
metabolic basis of inherited disease . 1.983 ; 1269 - 129

14. BRADY F.O. : Trends in Biochemical Sciences , 7 , N . 4 ,
143 , 1.982 .

15. BRADY F.O. , PANEMANGALORE M. ; DAY F.A. ; FISKIN A.M. and
PETERSON G. in : "Metallothionein " (Kägi , J.H.R. and
NORDBERG M. eds.) . Birklauser Verlag , Basel , 261
1.979 .

16. BREMNER I. , HOESKTRA W.G. ; DAVIES N.T. and YOUNG
B.W. : Chem. Biol. Interact . , 23 , 355 , 1.978 .

17. BREMNER I. ; MEHRA R.K. ; MORRISON J.N. and WOOD A.M. :
Biochem. J. , 235 , 735 , 1.986 .

18. BRISSOT P. ; WRIGH Tl. ; Ma WL ; WEISIGER Ra . Efficient
clearance on non - transferrin bound iron by rat liver .
Implications for hepatic iron loading in iron overload
states , J. Clin. Invest . 1.985 ; 76 ; 1463 - 1470 .

19. CEMPEL M. and WEEB M. : Biochem. Pharmacol. , 25 , 2067 ,
1.976 .

20. CHANG C.C. ; VANDER MALLIE R.J. and GARVEY J.S. :
Toxicol. Appl. Pharmacol. , 55 , 94 , 1.980 .
21. CHERIAN M.G. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 61 , 920 ,
1.974 .
22. COHEN C. ; BERSON Sd. ; SHULMAN G. ; BUDGEON Lr. ;
Immunohistochemical ferritin in hepatocellular carcinoma
Cancer .1.984 ; 53 ; 1931 - 1935 .
23. COUCOUVANIS S. ; SWENSON D. ; BANZIGER N.C. , MURPHY
C. ; HOLAH D.G. ; SFARNAS N. ; SIMOPOULOS A. and
KOSTIKAS A. : J. Am. Chem. Soc. , 103 , 3350 , 1.981 .
24. COUSINS R.J. : Physiol. Rev. , 65 , 238 , 1.985
25. COUSINS R.J. ; BARBER A.K. and TROUT , J.H.R. : J. Nutr. ,
103 , 964 , 1.973 .
26. COX C.C. and WATERS M.D. : Toxicol. Appl. Pharmacol. ,
46 , N 2 , 385 , 1.978 .
27. CROSBY W. H. : Blood , 22 , 441 . 1.963
28. DURNAM D.M. and PALMITER R.D. : J. Biol. Chem. , 256 ,
5712 , 1.981 .
29. DURNAM D.M. ; HOFFMAN J.S. ; QUAIFFE C.J. ; BENDITT E.P. ;
CHEN H.J. ; BRINSTER R.L. and PALMITER R.D. : Proc. Natl.
Acad. USA , 81 , 1053 , 1.984 .
30. DURNAM D.M. and PALMITER R.D. : Mol. Cell. Biol. , 4 , 484
1.984 .

31. EATON W. A. and LOVENBERG W. In : " Iron Sulfur Proteins
(Lovenberg W. ed.) Academic. Press. , New York , 11 , 131
1. 973 .
32. EATON D.L. ; STACEY N.H. ; WONG K.L. and KLAUSSEN C.D. :
Toxicol. Appl. Pharmacol. , 55 , 393 , 1. 980 .
33. ECKER D. J. ; BUTT T.R. ; STERNBERG E. J. ; NEEPER M.P.
DEBOUCK C. ; GORMAN J.A. and CROOKE S.T. : The Journal
of Biological Chemistry , 261 , N 36 , 16895 , 1. 986 .
34. EDWARDS J.A. and HOKE J.E. : Journal of Medicine , 9 , N 5
353 , 1. 978 .
35. EL SOBAKI F.A. ; RUMMEL W. : Res. Exp. Med. , 171 , 243 ,
1. 977 .
36. ENGSTRM B. ; NORIN H. ; JAMAID M. and INGMAN F. : Acta
Pharmacol. and Toxicol. , 46 , 219 , 1. 980 .
37. ETZEL K. R. and COUSINS R.J. : Proc. Soc. Exp. Biol.
Med. , 167 , 233 , 1. 981 .
38. FELDMAN S. L. ; SQUIBB K. S. and COUSINS R. J.
Toxicol. Environ. Health , 4 , 805 , 1. 978 .
39. FINCH C.A. ; HUEBERS H. Perspectives in iron metabolism.
N. Engl. J. Med. 1. 982 , 306 ; 1520 - 1528 .
40. FITZHUGH D.G. and MEILLER F.H. : J. PHARM. Exp. Tterapy ,
72 , 15 , 1. 941 .
40. bis. FRIBERG L. : Acta Med. Scand. , 138 ,(Suppl. 240) ,
1 , 1. 950 .

41. FLANAGAN P.R. ; MCLELLAN J.S. ; HAIST J. ; CHERIAN G. ;
CHAMBERLAIN M. and VALBERG L. : *Gastroenterology* , 74 ,
841 , 1.978 .
42. FOIDART M. ; EISEMAN J. ; ENGEL W. y Cols. Effect of Heme
administration on hemopexin metabolism in the rhesus
monkey . *J. Lab. Clin. Med.* 1.982 , 100 , 451 - 460 .
43. FORTIER R.L. ; MC GRATH W.P. and TOMEY S.L. ; *Clin. Chem.*
25 , 1466 , 1.979 .
44. FRIBERG L. : *Acta Med. Scand.* , 138 , (Suppl. 240) 1 ,
1.950 .
45. FRIEDMAN R. L. and STARK G.R. : *Nature* 314 , 637 , 1.985
46. FOTH W. and RUMMEL W. : *Physiology* , 53 , 724 , 1.973 .
47. GELLER B.L. and WINGE D.R. : *Arch. Biochem. Biophys.* , 213
109 , 1.979 .
48. GOOD M. and VASAK M. : *Biochemistry* 25 , 8353 , 1.986 .
49. GRANICK S. : *J. Biol. Chem.* 164 , 737 , 1.946 .
50. HAGEN K. S. ; REYNOLDS J. G. and HOLM R.H. : *J. Am.*
Chem. Soc. , 103 , 4054 , 1.981 .
51. HALIDAY J.W. ; POWELL L.W. Ferritin metabolism and the Liver
Semin , Liver Dis. 1.984 ; 4 ; 207 - 216 .

52. HALIDAY J.W. and POWELL L.W. : Clin. Chem. Acta 43 , 267 ,
1.973 .
53. HAMER D. H. : Ann. Rev. Biochem. ; 55 , 913 , 1.986 .
54. HAMILTON D. L. and VALBERG L.S. : Am. J. Physiol. 227 ,
1033 , 1.974 .
55. HARJU E. ; PAKARIEN A. ; LARMI T. . A comparison between
serum ferritin concentration and the amount of bone marrow
stainable iron Scan. J. Clin. Lab. Invest. 1.984 , 44 ,
555 - 556 .
56. HARTREE E. F. : Analyt. Biochem. , 48 , 422 , 1.972 .
57. HILDEBRANT C.E. and CRAM L.S. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med.
161 , 438 , 1.979 .
58. HILL C.H. ; MATRONE G. ; PAYNE W.L. and BARBER C.W. : J.
Nutr. , 80 , 227 , 1.983 .
59. HOLAH D.G. and COUCOVANIS D. .: J. Am. Chem. Soc. , 97
6917 , 1.975 .
60. HUEBERS H. ; HUEBERS E. ; FORTH W. ; RUMMEL W. : Binding
of iron to a non - ferritin protein in the mucosal cells
of normal and iron - deficient rats during absorption .
Life Sci. 10 , 1141 , 1.971 .
61. HUEBERS H. ; HUEBERS E. ; FORTH W. and RUMMEL W. . Life
Sci. , 10 , 1363 , 1.971 .
62. HUEBERS H. A. ; HUEBERS E. ; CSIBA E. ; RUMMEL W. and
FINCH C.A. : Blood , 61 , 283 , 1.983 .

63. HUNZIKER P.E. ; VON OVERKULM A.G. and KLOTEN Z.H. :
Inaugural Dissertation zur Erlangung Der
Philosophischen .Zürich , 58 , 1.986 .
64. HUNZIKER F.E. and KAGI J.H.R. : Biochem. J. 231 , 375 ,
1.985 .
- 64.bis. INSKIP H. and BERAL V. : Lancet , 896 , 1.982 .
65. JACOBS A. . A Low molecular weight intracellular iron
transport compounds. Blood . 1.977 ; 50 , 433 - 439 .
66. JACOBS R. M. ; FOX R. M. S . ; LEE A. O. et al.
(Abstract) : Fed. Proc. , 33 , 668 , 1.974 .
67. JOHNSON M.K. ; ROBINSON A.E. and THONSON A.J. In :
"Iron Sulfur Proteins" (Spiro , T.G. , Ed.) .Wiley , New
York , 367 , 1.982 .
68. KAGI J.H.R. and NORDBERG M. (eds.) in :
"Metallothionein" Birkhäuser Verlag , Basel , 1.979 .
69. KAGI J.H.R. in : "Metallothionein" : 2 nd International
Meeting on Metallothionein . Univ. Zürich . Birkhäuser
Verlag , Basel - Boston . 1.987 .
70. KAGI J.H.R. and VALLEE B.L. : J. Biol. Chem. , 235
3460 , 1.960 .
71. KAGI J.H.R. and VALLEE B.L. : J. Biol. Chem. , 236 ,
2435 , 1.961 .
72. KARIN M. ; IMBRA R. j. ; HEGUY A. and WONG G. : Mol.
Cell. Biol. , 5 , 2866 , 1.985 .

73. KARIN M. ; HASLINGER A. ; HOLTGREVE H. ; RICHARDS R. I.
KRAUTER P. ; WESTPHAL H. M. and BEATO M. : *Nature* ,
308 , 513 , 1.984 .
74. KIMURA M. ; OTAKI N. and IMANO M. in :
"Metallothionein" , KAGI J.H.R. and NORDBERG M. eds.
Birkhäuser Verlag , Basel , 181 , 1.979 .
75. KOHEN H. D. ; WIDER G. ; BAYER P. M. and MOSTBECK A.
Clin. Chem. ; 25 , 1466 , 1.979 .
76. KOJIMA M. , YOUNG C. R. and BATES W. G. *Biochim.
Biophys. Acta* , 716 , 273 , 1.982 .
77. KONIJN A. M. ; HERSKO C. Ferritin in inflammation . I.
Pathogenesis of impaired iron release . *Br. J. Haematol.*
1.977 , 31 , 7 - 16 .
78. KRAUSE J.R. ; STOLC V. Serum ferritin and bone marrow
iron stores - I . Correlation with absence of iron in
biopsy specimens . *Am. J. Clin. Path.* 1.979 ; 72 , 817
820 .
79. LABADIE G. U. ; HIRSCHHORN K. ; KATZ S. and BERATIS
N. G. : *Pediatr. Res.* , 15 , 257 , 1.981 .
80. LAUBER K. : *Z. Klin. Chem.* 3 , 96 , 1.965 .
81. LAUE R. W. ; IBERS J. A. ; FRANKEL R. B. ,
PAPAEFTHYMION G.C. , and HOLM R. H. : *J. Am. Chem. Soc.*
99 , 84 , 1.977 .
82. LAWVERYS T. : Pb , Cd , and Hg metabolism . *Comunicación
personal* , 1.978 .

83. LEBER A. P. and MIYA J. S. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*
37 , 403 , 1.976 .
84. LOW M.J. ; STORK P.J. ; HAMMER R.E. ; BRINSTER R. L. ;
WARHOL M. J. ; MANDEL G. and GOOMAN R. H. : *The*
Journal of Biological Chemistry , 261 , N 34 , 16260 ,
1.986 .
85. LÜPSCHITZ D. A. ; COOK J.D. and FINCH C.A. : *N. Engl.*
J. Med. 290 , 1213 , 1.974 .
86. MCCANCE R.A. and WIDDOESON E.M. : *Lacet* , 233 , 690 ,
1.937 .
87. MACK V. ; OWENS J. ; COOKSLEY WGE ; POWELL LW. ;
HALIDAY LW. *The effect of acute liver damage on*
circulating ferritin levels in vivo and the isolated
perfused rat liver . Br. J. Exp. Path. 1.985 , 66 , 185
191 .
88. MACK V. ; POWELL LW ; HALIDAY JW . *Detection and*
isolation of a hepatic membrane receptor for ferritin
J. Biol. Chem. 1.983 , 258 , 4672 , 4675 .
89. MANIS J. and SCHACHTER D. : *Am. J. Physiol.* , 207 ,
893 , 1.964 .
90. MARCEU N. and ASPIN N. : *Biochem. Biophys. Acta* ,
328 , 338 , 1.973 .
91. MEHRA R.K. and BREMNER I. : *Biochem. J.* , 227 , 903 ,
1.985 .
92. MINKEL D. J. ; POULSEN K. ; WIELGUS S. ; SHAW C.F. and
PETERING D. H. : *Biochem. J.* , 191 , 475 , 1.980 .

93. MONIA B.P. ; BUTT T.R. ; ECKER D.J. ; MIRABELLI C.K.
and CROCKE S.T. : The Journal of Biological Chemistry
261 , N 24 , 10957 , 1.966 .
94. MOORE W. Jr. ; STANA J.F. and CROCKER W.C. : Environ
res. , 8 , 159 , 1.973 .
95. MUÑOZ J.J. ; VALLS V. ; BATLLE M. ; ENRIQUEZ DE
SALAMANCA R. . Ferritina sérica . Biométrica . , 1.982 , 7
13 - 20 .
96. NORDBERG M. and KOJIMA Y. in : "Metallothionein" (KAGI
J.H.R. and NORDBERG M. eds.) Birkhäuser Verlag , Basel
41 , 1.979 .
97. NORDBERG G. F. ; PISCATOR M. and NORDBERG m. : Acta
Pharmacol. Toxicol. , 30 , 289 , 1.971 .
98. NORDBERG G. F. ; NORDBERG M. ; PISCATOR M. and
VESTERBERG O. : Biochem. J. , 126 , 491 , 1.972 .
99. OH S. H. ; DEAGEN J.T. ; WHANGER P.D. and WESWIG P. H.
Am. J. Physiol. , 234 , E 282 , 1.978 .
100. ONOSAKA S. and CHERIAN G. : Toxicology , 22 , 91 , 1.981
101. ONOSAKA S. and CHERIAN M.G. : Toxicol. Appl. Pharmacol.
63 , 270 , 1.982 .
102. OTVOS S. D. and ARMITAGE I.M. : Proc. Natl. Acad. Sci.
USA , 77 , 7094 , 1.980 .
103. OVERNEL J. and COOMBS T.L. : Biochem. J. , 183 , 277 ,
1.979 .

104. PEARSON W. N. and REICH M. B. : J. Nutr. , 99 , 1.989
105. PELAEZ M. T. ; RIBAS B. ; BENEIT J. V. and LORENZO P. ;
XVI International Congress of Therapeutics .Portugal ,
85 , 1.981 .
106. PIOTROWSKI J. R. , TROJANOWSKA B. and SAPOTA A. : Arch.
Toxicol ., 32 , 351 , 1.974 .
107. PIOTROWSKI J. R. , TROJANOWSKA B. , WIDNIEWSKA - KNYPL
J. M. and BOLANOWSKA W. : Toxicol. Appl. Pharmacol ., 27
11 , 1.974 .
108. PIOTROWSKI J. R. ; TROJANOWSKA B. WIDNIEWSKA - KNYPL J.
M. and BOLANOWSKA V. : Toxicol. Appl. Pharmacol ., 21 ,
11 , 1.974 .
109. PISCATOR M. : Nord. Hyg. Tidskr , 45 , 76 , 1.964 .
110. POLLACK S. and LASKY F. D. : J. Lab. Clin. Med. ; 87, 670
1.976 .
111. POWELL L. W. . Metals and the liver . Dis. 1.984 ; 4 , 3 -
7 .
112. PRINS H. W. and VAN DER HAMER C. J. A. : Life Sciences
28 , 2953 , 1.981 .
113. PROHASKA J. R. ; MOWALY M. and GANTHER H. E. : Chem.
Biol. Interactions , 18 , 253 , 1.977 .
114. PROBST G. S. ; BOUSQUET W. F. and MIYA T. S. : Toxicol.
Appl. Pharmacol. , 39 , 61 , 1.977 .

115. PULIDO P. ; KAGI J.H.R. and VALLEE B.L. : Biochemistry ,
5 , 1768 , 1.966 .
116. REFSUM S. B. ; SCHREINER B. B. Regulation of iron
balance by absorption . A critical review and a new
hypothesis . Scan. J. Gastroenterol. 1.984 ; 19 ; 867 -
874 .
117. RIBAS B. ; BASAGOITI I. ; BRENES M.A. ; INIESTA M.P.
and SANCHEZ REUS M.I. : Trace Elements , 5 , 413 ,
1.986 .
118. RIBAS B. : An. Red. Acad. Farm. 47 , 185 , 1.981 .
119. RICHARDS M.P. and COUSINS R.J. : Biochem. Biophys.
Res. Commun. , 75 , 286 , 1.977 .
120. SABBIONI E. and MARAFANTE E. . Environ. Physiol.
Biochem. , 5 , 465 , 1.975 .
121. SASS B. and BREMNER I. : Journal of Inorganic
Biochemistry , 11 , 67 , 1.979 .
122. SATO M. and BREMNER I. : Biochem. J. , 223 , 475 ,
1.984 .
123. SAVIN M. A. ; COOK J. D. . Mucosal iron transport by
rat intestine . Blood , 1.980 , 56 , 1029 - 1035 .
124. SAVIN M. A. and COOK J. D. : Blood , 56 , N° 6 , 1029
1.980 .
125. SEARLE P. F. : Biochemical Society Transactions , 14 ,
4 , 584 , 1.987 .

126. SHAIKH Z. A. and SMITH J. C. : Chem. Biol. Interact . ,
15 , 327 , 1.976 .
127. SHAIKH Z. A. and SMITH J. C. : hem. Biol.
Interactions. , 19 , 167 , 1.977 .
128. SHAIK Z. A. and SMITH J.C. : Chem. Biol. interactions ,
19 , 167 , 1.977 .
129. SKIKNE BS. ; LYNCH SR. Role of gastric acid in food
iron absorption . Gastroenterology . 1.981 , 81 , 1068 -
1071 .
130. SOBOCINSKI P. Z. ; CANTERBURY W. S. Jr. ; Mapes C.A. and
Dinterman R.E. : Am. J. Physiol. , 234 , E 399 , 1.978 .
131. SQUIBB K. S. and COUSINS R. J. : Environ . Physiol.
Biochem. , 4 , 24 , 1.974 .
132. SQUIBB K. S. ; COUSINS R. J. and FELDMAN S. L. :
Biochem. j. , 164 , 223 , 1.977 .
133. STONARD M.B. and WEBB M. : Chem. Biol. Interactions ,
349 , 1.976 .
134. STOW H.D. ; WILSON M. and GOYER R. A. : Arch. Pathol
94 , 398 , 1.972 .
135. STOWE H.D. ; WILSON M. and GOYER R.A. : Arch. Pathol.
94 , 398 , 1.972 .
136. SUGAWARA N. : Toxicol. Appl. Pharmacol. , 42 , 377 ,
1.977 .

137. SUZUKI K.T. and YOSHIKAWA H. : Ind. HEALTH 14 , 25 ,
1.976 .
138. SUZUKI T. and YOSHIDA A. : Nutr. Reports . Internl.
16 , 769 , 1.977 .
139. SUZUKI K.T. and YAMAMURA M. : Biochem. Pharmacol. 29 ,
2407 , 1.980 .
140. SUZUKI K. T. ; YAMURA M. and MORI T. : Arch. Environm
Contam. Toxicol. , 9 , 415 , 1.980 .
140. bis. UHEYAMA N. ; NAKATA M. ; FUJI M. A. ; TERAKAWA T.
and NAKAMURA A. . Inorg. , Chem. 24 , 2190 , 1.985 .
141. VALBERG L. S. ; SORBIE J. and HAMILTON D.L. : Am. J.
Physiol. , 231 , 462 , 1.976
142. VALBERG L.S. ; SORBIE J. and LUDWIG J. : Br. J.
Haematol. , 35 , 321 , 1.977 .
143. VALLEE B.L. in : "Metallothionein" (KAGI J.H.R. and
NORDBERG M. eds.) Birkhäuser Verlag , Basel , 19 ,
1.979 .
144. VAN KAMPEN E. J. and ZIJLTRA W. G. : Clin. Chem.
Acta 6 , 538 , 1.981 .
145. VASAK M. : J. Am. Chem. Soc. 102 , 3953 , 1.980 .
146. VASAK M. and KAGI J.H.R. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA
78 , 6709 , 1.981 .
147. WAALKES M.P. and BELL J. U. : Life Sci. , 27 , n 7 ,
585 , 1.980 .

148. WEBB M. : Biochem. Pharmacol. 21 , 2751 , 1.972 .
149. WESER U. ; RUPP H. ; DONAY F. ; LINNEMANN F. ;
VOELTER W. ; VOETSCH W. and JUNG G. : Eur. J.
Biochem. , 39 , 127 , 1.973 .
150. WESER U. ; DONAY F. and RUPP H. : FEBS , lett , 32 .
171 , 1.973 .
151. WILSON R. A. ; DEEDS F. and COX A. J. Jr. : J. Pharm.
Exp. , Therap , 71 , 222 , 1.941 .
152. WINGE D. R. ; PREMAKUMAR R. and RAJAGOPALAN K. V. :
Arch. Biochem. Biophys. ; 170 , 242 , 1.975 .
153. WINGE D. R. and RAJAGOPALAN K. V. : Arch. Biochem.
Biophys , 153 , 755 , 1.972 .
154. WINGE D.R. and MIKLOSSY K.A. : The Journal of
Biological Chemistry , 257 , 3471 , 1.982 .
155. WINTROBE M.M. : Clinical Hematology 7 th ed.
Philadelphia , Lea and Febiger , 125 , 1.974 .
156. WORWOOD M. Serum ferritin . JACOBS A. y WORWOOD M.
Ed. En : Iron in Biochemistry and Medicine . 1.980 .
203 - 244 .
157. WORWOOD M. , CRAGG SJ. ; WILLIAMS AM. ET AL. The
clearance of I 131 human plasma ferritin in man .
Blood. 1.982 ; 60 ; 827 - 833 .
158. WORWOOD M. and JACOBS A. : Life Sci. , 10 , 1363 ,
1.971 .

159. YOUNG SP. ; AISEN P. Transferrin receptors and the uptake and release of iron by isolated hepatocytes . Hepatology 1.981 ; 1 ; 114 - 119 .
160. YOUNG S. ; BOMFORD A. Transferrin and cellular iron exchange. Clin. Sci. 1.984 , 67 , 273 - 278 .
161. ZHALER W. L. and CLEALND W.W. : The Journal of Biological Chemistry , 243 , N 4 , 716 , 1.978 .
162. ZUYDERHOUDT FMJ. , LINTHORST C. ; HENEGEVELD P. on the iron content of human ferritin , specially in acute viral hepatitis and iron overload . Clin. Chim. Acta 1.978 , 90 , 93 - 99 .