



Las metalotioneínas de mamífero como agentes detoxificadores de plomo(II)

Catalina Trinidad Pérez Zúñiga

Tesis Doctoral

Estudio de Doctorado en Química

Directores

Mercè Capdevila Vidal

Òscar Palacios Bonilla

Departamento de Química

Facultad de Ciencias

2013

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor por Catalina Trinidad Pérez Zúñiga

Visto bueno

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'M. Capdevila Vidal', written in a cursive style.

Dra. Mercè Capdevila Vidal

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'O. Palacios Bonilla', written in a cursive style.

Dr. Òscar Palacios Bonilla

Bellaterra, 25 de Septiembre de 2013.

Agradecimientos

Primero quiero agradecer a Dios por estar siempre a mi lado y darme las fuerzas que necesité para este largo proceso de estar lejos de mis seres amados y mi país "Chile".

Agradezco a mi amor incondicional Mario, que me acompañó en este gran desafío y siempre ha estado junto a mí sin importar la distancia, porque esta puede impedir los abrazos y besos pero nunca los sentimientos.

Gracias a toda mi gran familia, especial y única: a mis padres Miguel y Trinidad que me brindan su apoyo y amor cada día, a mis hermanos Miguel, Emilio y Francisca quienes a su manera están siempre conmigo. A mis tías Quenita y Pilar por cada mensaje y conversación oportuna. A mis tíos Quelo y Marcos y a mi primo Caquito. A mi Cuñis Mary por no dejarme nunca. A mis sobrinitos: mis príncipes Nicolás, Lucas, Agustín y Rafael, y a mis Totitos Cristóbal y Martín por darme tanto amor a la distancia. A mis Tatitas y Yuyu, y a mi Abueli que aún me espera.

Dar las gracias a mi familia catalana de Montse y Oriol por estar siempre conmigo. Y a mi amiga Lola por todo lo compartido en estos años. A mis amigas Dani, Jesi y Sole por todo.

Gracias a todos mis amigos que encontré en la UAB, por compartir tantos momentos buenos y malos y por apoyarme en todo, a Joan, Marta, Mireia, Katia, Silvia, Tami y Montse y gracias a otra parte importante "mis compañeros" Sandri, Adaris, Dani, Sele, Susi, Sole, AnaMari, a todos ellos les agradezco lo vivido en estos años. A Jordi, Roger y Joan Carles y así como a mi profe Sergio y Pedro por brindarme su apoyo y preocupación.

También agradecer a mis directores Mercè Capdevila y Òscar Palacios por estos años compartidos y por lo que hicieron por mí. A la Dra. Silvia Atrian por su colaboración en nuestro grupo de investigación.

El trabajo descrito en esta memoria se llevó a cabo gracias a las siguientes fuentes de financiamiento:

**Proyectos financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación:*

- 1. "Estructura, función e interacción de proteínas y redes de respuesta a metales: Metalotioneínas y Metalómica"; DGI (BIO2006-14420-C02-02); Investigador principal: Mercè Capdevila Vidal.*
- 2. "Metalómica básica (proteínas, vías y redes de interacción metales-sistemas biológicos) y aplicada"; DGI (BIO2009-12513-C02-02); Investigador principal: Mercè Capdevila Vidal.*

**Concesión de una beca PIF (4 años de duración) de la Universitat Autònoma de Barcelona para realizar el doctorado en el grupo de investigación Metal·lotioneïnes: relació estructura/funció i aplicacions.*

Además agradezco a todos los miembros del Servicio de Análisis Químico (SAQ) (José M^a, Maite, M^a Jesús y Sandra), en especial a la Dra. Alba Eustaquio y al Dr. Ignasi Villarroya por su colaboración y ayuda con las medidas de ESI-MS y DC, respectivamente.

Resumen

El plomo es uno de los metales más nocivos para la salud humana y su incidencia en la misma deber ser tomada en cuenta debido a su amplia distribución en el medio ambiente. El catión Pb(II) interactúa preferentemente con proteínas que contienen Zn(II) (ALAD, CadC, GATA, dedos de Zn) y Ca(II) (CaM, PKC, syt) causando no sólo interferencias en algunos procesos metabólicos (principalmente la biosíntesis de hemoglobina), sino que también inhibe varias enzimas, provocando daños en el sistema nervioso central (SNC). Frente a estos efectos nocivos del Pb(II), los seres vivos han desarrollado mecanismos de defensa y detoxificación, entre los que se encuentran las metalotioneínas.

Las metalotioneínas (MTs) son unas proteínas muy versátiles, presentes en la mayoría de organismos, cuyo inusual alto contenido en Cys les confiere una alta capacidad para enlazar metales pesados (Zn(II), Cd(II), Cu(I), Ag(I), Hg(II), Pb(II), etc.), tanto *in vivo* como *in vitro*, permitiéndoles actuar como agentes detoxificadores.

En base a estos antecedentes y a los estudios desarrollados previamente por este grupo de investigación, en esta Tesis Doctoral se pretende estudiar el posible papel de “Las metalotioneínas de mamífero como agentes detoxificadores de Pb(II)”. Para ello, se estudia la habilidad coordinante de las diferentes isoformas de MTs de mamífero, MT1 y MT2 (ubicuas), MT3 (cerebro) y MT4 (epitelio escamoso estratificado), y de la MT de levadura, Cup1, frente a Pb(II). Simultáneamente, se analizan los factores experimentales (concentración de MT, T^a, pH y tiempo de estabilización) que pueden afectar a dicha coordinación. Estos estudios se han llevado a cabo mediante la utilización de técnicas espectroscópicas (DC y UV-vis), espectrométricas (ESI-TOF MS) y microcalorimétricas (ITC). Además, en este trabajo se ha intentado relacionar el carácter de Zn- o Cu-tioneína de las MTs estudiadas con su capacidad coordinante frente a Pb(II). Por este motivo, se ha incluido el estudio de una Cu-tioneína genuina como es la isoforma Cup1 de levadura.

En general, los resultados obtenidos revelan una gran complejidad en la interacción de las MTs de mamífero con Pb(II), de manera que no se pueden hacer extrapolaciones sobre el potencial comportamiento de una determinada isoforma de MT frente a Pb(II) a partir de su carácter de Zn- o Cu-tioneína. Como resultados específicos, se sabe que MT3 es la que presenta una mayor capacidad detoxificadora frente al ión Pb(II) en condiciones similares a las fisiológicas (pH 7.0 y 37 °C). Adicionalmente, se concluye que, entre los factores experimentales estudiados; el pH, es el que tiene mayor influencia en la formación y estabilidad de las especies Pb-MT. Por otra parte y en relación al carácter de Zn- o Cu-tioneína de las MTs, se ha comprobado que éste no determina completamente la eficacia de la coordinación del ión Pb(II) a la proteína, si bien influye en la manera en que el plomo se coordina a ella.

Abstract

Lead is one of the major hazards in human health and its impact on it must be taken into account due to its wide distribution in the environment. The Pb(II) cation preferentially interacts with proteins containing Zn(II) (ALAD, CadC, GATA, Zn-fingers) and Ca(II) (CaM, PKC, syt) causing not only interferences in some metabolic processes (mainly the biosynthesis of hemoglobin) but also the inhibition of several enzymes and damages at the central nervous system (CNS). Living organisms have developed defense and detoxification mechanisms against these deleterious effects of Pb(II), among which we can find metallothioneins (MTs).

MTs are among the most versatile metal-binding proteins present in all organisms. Their unusually high Cys content confers them a high capacity to chelate heavy metal ions (e.g. Zn(II), Cd(II), Cu(I), Ag(I), Hg(II), Pb(II)), both *in vivo* and *in vitro*, allowing them to act as detoxifying agents.

Taking into account this background and the previous studies of our research group, in this PhD Thesis we intended to study the possible role of "The mammalian metallothioneins as detoxifying agents for Pb(II)". To this end, we studied the coordinating ability of the different mammalian MT isoforms, MT1 and MT2 (ubiquitous), MT3 (brain-specific) and MT4 (stratified epithelium) and of yeast, Cup1, towards Pb(II). Simultaneously, we analyzed the experimental factors (concentration of MT, T, pH and stabilization time) that may affect such coordination. Spectroscopic (DC, and UV-vis), spectrometric (ESI-TOF MS) and microcalorimetric (ITC) techniques were used. In addition, the Zn or Cu-thionein character of the MTs under study was related to their Pb(II)-binding ability. As a reference, the genuine Cu-thionein Cup1 from yeast was also studied following the same strategy.

Overall, the results show a complex interaction between Pb(II) and each of the mammalian MTs. Therefore, the Pb(II)-binding abilities of a determined mammalian MT isoform cannot be extrapolated from its known Zn- or Cu-thionein character. Turning to specific results, we conclude that MT3 shows the highest Pb(II)-detoxifying capacity under conditions similar to the physiological ones (pH 7.0, 37 °C). Furthermore, our results lead us to conclude that, among the experimental factors analyzed here, pH shows the highest influence on the formation and stability of the Pb-MT species. Moreover, it has been demonstrated that the Cu- or Zn-thionein character of MTs does not completely determine the efficiency of the Pb(II) coordination to the protein, but that it influences the way in which the lead coordinates to the protein.

Abreviaturas y acrónimos

aa	Aminoácido/s
Ace1	Factor de transcripción en levaduras
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
ALAD	Ácido δ -aminolevulónico deshidratasa
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosintrisfosfato
CadC	Proteína metaloreguladora (“ <i>Cadmium efflux system accessory protein</i> ”)
CaM	Calmodulina
CIs	Cuerpos de inclusión
CP	Cadena peptídica
Crs5	Isoforma Crs5 de levadura
CSD	Cambridge Structural Database
Cup1	Isoforma Cup1 de levadura
Cys	Cisteína
DC	Dicroísmo circular
Dif. UV-vis	Diferencia de absorción ultravioleta visible
DMSA	Ácido dimercaptosuccínico
DTNB	Ácido ditionitrobenzoico
ϵ	Coefficiente de extinción molar
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAAEAE	Secuencia aa: Glu-Ala-Ala-Glu-Ala-Glu
Ec	Energía del complejo
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Ee	Energía de enlace
Ee, tetra	Energía de enlace de los complejos tetracoordinados
Ee, tri	Energía de enlace de los complejos tricoordinados
Ef	Energía final
Ei	Energía inicial
EI	Energía del ligando
eq	Equivalente/equivalentes molar
EP	Enfermedad de Parkinson
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por electrospray
EXAFS	<i>Extended X-Ray Absorption Fine Structure</i>
GATA	Proteína-factor de transcripción capaz de unirse a la secuencia de ADN “GATA” (donde G = Guanina, A = Adenina y T = Timina)
GIF	Factor inhibidor del crecimiento neuronal
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
Glu	Ácido Glutámico
GSH	Glutación
His	Histidina
HIV-CCGC	secuencia aa: AcHN-VKCFNCGKEGGIARNCRA- CONH ₂
HIV-CCHC	secuencia aa: AcHN-VKCFNCGKEGHIARNCRA-CONH ₂
HIV-CCHH	secuencia aa: AcHN-VKCFNCGKEGHIARNHRA-CONH ₂
HP2	Protamina 2 humana
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
ICP-AES	Espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado por inducción
ITC	Calorimetría isotérmica de titulación
K	Constante de afinidad
L	Ligando
Lys	Lisina
M	Macromolécula

M(II)	Metal divalente
Met	Metionina
MT/MTs	Metalotioneína / metalotioneínas
MT1	Isoforma 1 de metalotioneína de mamífero
MT1E	Isoforma 1E de metalotioneína de humano
MT2	Isoforma 2 de metalotioneína de mamífero
MT2A	Isoforma 2A de metalotioneína de humano
MT3	Isoforma 3 de metalotioneína de mamífero
MT4	Isoforma 4 de metalotioneína de mamífero
m/z	Masa por carga
N	Número de equivalentes
Qi	Calor inicial
PCA	Penicilina
PbBPs	Proteínas de unión a plomo
PbrR691	Proteína reguladora de la familia de factores de transcripción MerR
PC/PCs	Fitoquelatina/Fitoquelatinas
PDB	Protein Data Base
PKC	Proteína quinasa C
Pro	Prolina
R	Constante de Boltzmann (1,9 cal/K·mol)
RMN	Resonancia magnética nuclear
RSD	Desviación estándar relativa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
S/SCys	Azufre / azufre cisteínico
Ser	Serina
SNC	Sistema nervioso central
Sp1	Factor de transcripción humano
Syt	Sinaptotagmina
T	<i>Tetrahymena</i>
T^a	Temperatura
TC	Transferencia de carga
TCLM	Transferencia de carga del ligando al metal
T₅-C-P-C-P₉	Secuencia aa: Thr-Cys-Pro-Cys-Pro
t_{est}	Tiempo/tiempos de estabilización
TFIIIA	Factor de transcripción IIIA
TOF	Tiempo de vuelo/ <i>Time of flight</i>
TRI	Familia de péptidos
TRIL12C	secuencia aa: Ac-G LKALEEK LKACEEK LKALEEK LKALEEK G-NH ₂
TRIL16C	secuencia aa: Ac-G LKALEEK LKALEEK CKALEEK LKALEEK G-NH ₂
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV-vis	Ultravioleta-visible
XAS	<i>X-ray Absorption Spectroscopy</i>
ZEN	Neuronas enriquecidas en zinc
Zn-/Cu-th	Zn-/ Cu-tioneína
3D	Tridimensional
1° eq de Pb(II)	Primer equivalente de plomo(II)
10 eq de Pb(II)	Diez equivalentes de plomo(II)

ÍNDICE



Índice

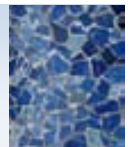
I. Introducción	1
1. Metalotioneínas	1
1.1. Definición y características.....	1
1.2. Estructura y reactividad	3
1.3. Papel de las metalotioneínas en el metabolismo de los metales esenciales y tóxicos	6
1.4. Clasificación de las metalotioneínas	7
2. Metalotioneínas de mamífero	8
2.1. MT1 y MT2	10
2.1.1. Características relevantes.....	10
2.1.2. Antecedentes estructurales.....	10
2.1.3. Aspectos funcionales de MT1 y MT2	12
2.2. MT3	13
2.2.1. Características relevantes.....	13
2.2.2. Antecedentes estructurales.....	14
a. Estructura de MT3 con iones metálicos divalentes (Cd y Zn)	14
b. Características estructurales de Cu(I) enlazado a MT3.....	16
2.2.3. Reactividad de MT3	17
2.2.4. Función de MT3 en el cerebro	18
2.3. MT4	19
2.3.1. Características relevantes.....	19
2.3.2. Antecedentes de la capacidad coordinante, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	20
2.3.3. Posibles funciones de MT4	22
3. Metalotioneínas de levadura	22
3.1. Cup1	23
4. Plomo(II).....	24
4.1. Propiedades generales	24
4.2. Coordinación y geometría	24
4.3. Efecto del par inerte	26
4.4. Tiolatos de Pb(II)	26
4.5. Espectroscopía de RMN de ²⁰⁷ Pb	29
5. Química biológica del Pb(II)	30
5.1. Toxicidad del Pb(II).....	30
5.2. Coordinación de Pb(II) a proteínas de zinc.....	32
<input type="checkbox"/> Ácido aminolevulínico deshidratasa, ALAD	32
<input type="checkbox"/> GATA.....	33
<input type="checkbox"/> Dedos de zinc.....	34
<input type="checkbox"/> PbrR691	36
<input type="checkbox"/> CadC	37
<input type="checkbox"/> Protamina 2 humana (HP2)	39
5.3. Coordinación de Pb(II) a SCys en péptidos	40
<input type="checkbox"/> Péptidos TRI.....	40
<input type="checkbox"/> Péptidos CoilSer.....	41
<input type="checkbox"/> Glutación	41
<input type="checkbox"/> Fitoquelatinas	43
5.4. Antecedentes de la interacción del Pb(II) con metalotioneínas (MTs).....	44
II. Objetivos	49

III. Metodología de trabajo	51
1. Procedimiento general.....	51
2. Factores experimentales que afectan a las especies Pb-MT.....	53
2.1. Efecto de la variación de pH.....	53
2.2. Efecto de la concentración de la proteína	54
2.3. Efecto de la temperatura	55
2.4. Efecto del tiempo de estabilización por equivalente de Pb(II).....	55
IV. Resultados y Discusión	61
1. Caracterización de los complejos Zn-MT de partida	61
1.1. Zn-MT1 y sus dominios Zn- α MT1 y Zn- β MT1	61
1.2. Zn-MT2 y sus dominios Zn- α MT2 y Zn- β MT2.....	62
1.3. Zn-MT3 y sus dominios Zn- α MT3 y Zn- β MT3.....	62
1.4. Zn-MT4	63
1.5. Zn-Cup1.....	64
2. Estudio de la habilidad coordinante de las diferentes isoformas de MT de mamífero, sus dominios α y β , y la isoforma Cup1 de levadura frente a Pb(II).....	65
2.1. Habilidad coordinante de la isoforma MT1 de mamífero y sus dominios α y β frente a Pb(II)	65
2.1.1. Isoforma MT1 de mamífero	65
2.1.1.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis	65
2.1.1.2. Estudio por espectroscopía de masas, ESI-MS.....	74
2.1.1.3. Estudio por microcalorimetría, ITC	78
2.1.2. Dominio α MT1	80
2.1.2.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis	80
2.1.2.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS	84
2.1.2.3. Estudio por microcalorimetría, ITC	87
2.1.3. Dominio β MT1	88
2.1.3.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis	88
2.1.3.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS	93
2.1.3.3. Estudio por microcalorimetría, ITC	95
2.1.4. Análisis global del estudio de la habilidad coordinante de la isoforma MT1 y sus dominios α y β frente a Pb(II).....	96
2.2. Habilidad coordinante de la isoforma MT2 de mamífero y sus dominios α y β frente a Pb(II).....	99
2.2.1. Isoforma MT2 de mamífero	99
2.2.1.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis	99
2.2.1.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS	105
2.2.1.3. Estudio por microcalorimetría, ITC	109
2.2.2. Dominio α MT2.....	110
2.2.2.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis	110
2.2.2.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS	113
2.2.3. Dominio β MT2	116
2.2.3.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis	116
2.2.3.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS	121
2.2.4. Análisis global del estudio de la habilidad coordinante de la isoforma MT2 y sus dominios α y β frente a Pb(II).....	123
2.3. Habilidad coordinante de la isoforma MT3 de mamífero y sus dominios α y β frente a Pb(II)	125
2.3.1. Isoforma MT3 de mamífero	125
2.3.1.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis	125
2.3.1.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS	133

2.3.1.3. Estudio por microcalorimetría, ITC.....	138
2.3.2. Dominio α MT3.....	139
2.3.2.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis.....	139
2.3.2.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS.....	144
2.3.2.3. Estudio por microcalorimetría, ITC.....	147
2.3.3. Dominio β MT3.....	148
2.3.3.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis.....	148
2.3.3.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS.....	152
2.3.3.3. Estudio por microcalorimetría, ITC.....	155
2.3.4. Análisis global del estudio de la habilidad coordinante de la isoforma MT3 y sus dominios α y β frente a Pb(II).....	156
2.4. Habilidad coordinante de la isoforma MT4 de mamífero frente a Pb(II).....	158
2.4.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis.....	158
2.4.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS.....	160
2.4.3. Estudio por microcalorimetría ITC.....	161
2.4.4. Análisis global del estudio de la habilidad coordinante de la isoforma MT4 frente a Pb(II).....	162
2.5. Habilidad coordinante de la isoforma Cup1 de levadura frente a Pb(II).....	163
2.5.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis.....	163
2.5.2. Estudio por espectrometría de ESI-MS.....	172
2.5.3. Estudio por microcalorimetría, ITC.....	175
2.5.4. Análisis global del estudio de la habilidad coordinante de la isoforma Cup1 frente a Pb(II).....	176
3. Análisis de los factores experimentales que afectan la capacidad coordinante de las MTs de mamífero frente a Pb(II).....	179
3.1. Efecto del pH.....	179
3.1.1. Isoforma MT1.....	179
3.1.2. Isoforma MT2.....	182
3.1.3. Isoforma MT3.....	183
3.1.4. Isoforma MT4.....	183
3.2. Efecto de la concentración de la proteína.....	184
3.2.1. Isoforma MT1.....	184
3.2.2. Isoforma MT2.....	186
3.2.3. Isoforma MT3.....	187
3.2.4. Isoforma MT4.....	189
3.3. Efecto de la temperatura.....	189
3.3.1. Isoforma MT1.....	189
3.3.2. Isoforma MT2.....	192
3.3.3. Isoforma MT3.....	192
3.3.4. Isoforma MT4.....	194
3.4. Efecto del tiempo de estabilización (t_{est}).....	194
3.4.1. Isoforma MT1.....	194
3.4.2. Isoforma MT2.....	196
3.4.3. Isoforma MT3.....	198
3.4.4. Isoforma MT4.....	198
3.5. Efecto del exceso de Pb(II).....	198
3.5.1. Isoforma MT1.....	199
3.5.2. Isoforma MT2.....	200
3.5.3. Isoforma MT3.....	201
3.5.4. Isoforma MT4.....	201
3.6. Análisis global de los factores experimentales que afectan la capacidad coordinante de las MTs de mamífero frente a Pb(II).....	202

4. Definición de un “modelo” de comportamiento fisiológico de cada isoforma de MT de mamífero frente a Pb(II).....	205
4.1. Estudios de competición de las isoformas de MT de mamífero con EDTA frente a Pb(II).....	212
5. Comparación del comportamiento de las diferentes MTs estudiadas frente a Pb(II). Discusión sobre el entorno de coordinación de este ión y su correlación con el carácter de Zn- o Cu-tioneína de cada MT y con los datos bibliográficos	219
5.1. Comparación del comportamiento de las MTs estudiadas frente a Pb(II)	219
5.1.1. Datos espectroscópicos	220
5.1.1.1. DC.....	220
5.1.1.2. UV-vis	223
5.1.2. Datos de ESI-MS.....	230
5.1.3. Datos de ITC.....	234
5.2. Correlación entre el comportamiento de las MTs estudiadas frente a Pb(II), su carácter Zn- o Cu-tioneína y los datos bibliográficos	239
5.2.1. Comparación de las absorciones observadas por dif. UV-vis con los datos bibliográficos reportados sobre la coordinación de Pb(II) a proteínas de zinc	239
5.2.2. Comparación de las absorciones observadas por dif. UV-vis con los datos bibliográficos reportados en un estudio teórico.....	241
5.2.3. Correlación entre el entorno de coordinación del ión Pb(II) y el carácter de Zn- o Cu-tioneína de las MTs estudiadas frente a Pb(II).....	243
V. Conclusiones.....	249
VI. Parte Experimental y Técnicas Utilizadas	251
1. Procedimientos experimentales.....	251
- Obtención y caracterización de las metalotioneínas	251
- Caracterización de las especies Pb(II)-MT formadas.....	252
2. Técnicas utilizadas	252
- Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES).....	252
- Espectroscopía de absorción de UV-visible (UV-vis)	253
- Espectroscopía de Dicroísmo Circular (DC)	254
- Espectrometría de masas (ESI-TOF-MS).....	256
- Microcalorimetría por ITC.....	257
3. Preparación de las soluciones utilizadas.....	260
- Solución de agente valorante Pb(ClO ₄) ₂	260
- Soluciones tampón de Tris-HClO ₄ a pH 4.5 y pH 7.0.....	260
- Soluciones de fase móvil para ESI-MS.....	260
- Solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).....	260
VII. Anexo.....	261
Anexo 1. Tabla de datos construida a partir de las estructuras depositadas en el CSD referente a los números y entornos de coordinación de los compuestos de Pb(II).	261
Anexo 2. Tabla de caracterización de las especies Zn-MT iniciales.....	262
Anexo 3. Tablas de absorciones de los espectros de diferencia de UV-vis de las MTs estudiadas frente a Pb(II).....	263
VIII. Bibliografía.....	269

I. INTRODUCCIÓN



I. Introducción

1. Metalotioneínas

1.1. Definición y características

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas de bajo peso molecular (3-10 KDa) con una composición de aminoácidos (aa) característica,^{1,2} siendo especialmente ricas en cisteínas (un 30% de sus aa) lo cual les confiere una elevada capacidad para enlazar iones metálicos.^{3,4,5,6,7} Es precisamente la formación de los enlaces metal-cisteína lo que determina las características estructurales de los complejos metal-proteína. Otras características generales en las MTs son la escasez de residuos hidrofóbicos y la ausencia de aa aromáticos, por lo que se facilita su análisis por espectroscopía óptica, debido a la ausencia de la absorción a 280 nm.^{8,9} Adicionalmente, las metalotioneínas también presentan una elevada estabilidad térmica.¹⁰

La primera metalotioneína fue descubierta hace más de 50 años por Margoshes y Vallee en 1957, durante un estudio diseñado para identificar la proteína responsable de la acumulación de cadmio.¹¹ Las MTs están presentes en todas las familias de los reinos animal y vegetal (Fig. 1): desde las bacterias hasta los seres humanos. Siendo particularmente comunes entre los animales, hongos y plantas, y a menudo mostrando varias isoformas en cada uno de estos organismos.¹²

En los vertebrados, la mayoría de las MTs constan de unos 60 aminoácidos,^{13,14,15,16} en donde en los mamíferos se han descubierto cuatro isoformas de MT, designadas como MT1,¹¹ MT2,¹¹ MT3¹⁷ y MT4.¹⁸ En condiciones fisiológicas, estas metalotioneínas enlazan entre el 5 y el 20% del zinc intracelular total.¹⁹ Si bien las MTs están principalmente localizadas en el citoplasma, bajo condiciones de estrés, tales como la irradiación UV, también se pueden trasladar al núcleo donde ayudan a activar los factores de transcripción que contienen dedos de zinc, promoviendo el intercambio de zinc.²⁰

Habitualmente las MTs de mamífero han sido aisladas a partir del hígado, el riñón y otros tejidos que acumulan metales. Su síntesis es inducida, tanto por la presencia de metales como cadmio, zinc o cobre, como por otros factores que generan estrés celular.^{21,22,23} De forma natural son aisladas conteniendo Zn(II) y/o Cu(I).²⁴ Varios estudios han mostrado que las MTs de mamífero pueden unir 7 iones Zn(II) y/o Cd(II) y hasta 12 iones Cu(I) por proteína.^{14,15,16,25,26,27}

Por otro lado, en las MTs de organismos inferiores como son las especies de *Tetrahymena* (*T.*)²⁸ (protozoos ciliados), que se diferencian de las de mamífero por ser más largas y tener entre 22 y 54 Cys, aa aromáticos e histidina (His), se han observado distintos tipos de preferencia metálica, ya sea, Cd-MTs dentro de la subfamilia 7a y

otras Cu-MTs dentro de la subfamilia 7b, como por ejemplo en las MTs de *T. thermophila*²⁸ se diferencian las Cd-MTs: TtherMTT3 y TtherMTT5,²⁹ y las Cu-MTs: TtherMTT2 y TtherMTT4.³⁰ Así también, en las isoformas de MT del nematodo *Caenorhabditis elegans* (*Ce*), CeMT-1 y CeMT-2 se diferencian en la especificidad por Zn(II) y Cd(II), donde frente a Cd(II) se forman las especies Cd₄Zn₂-CeMT-2 y CdZn₆-CeMT-1, mientras que frente a Zn(II) se forman las especies Zn₇-CeMT-1 y Zn₆-CeMT-2.³¹ Además, en otros organismos inferiores como *Drosophila* sp.^{32,33} y *Cryptococcus neoformans*³⁴ se encuentran típicamente como un complejo de Cu.^{35,36}

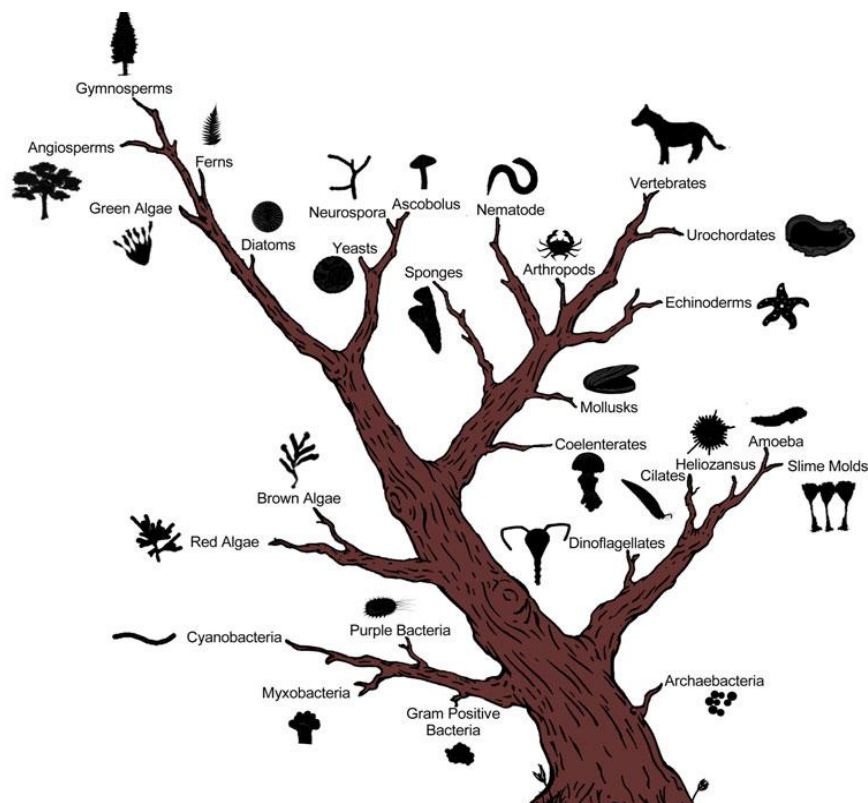


Figura 1. El árbol de la vida, que muestra las diversas ramas en que los organismos vivos pueden ser clasificados.³⁷

Muchas de las metaloproteínas conocidas tienen una función que depende, en mayor o menor medida, del ión metálico enlazado. La hemoglobina, por ejemplo, contiene un ión Fe(II/III) en el centro de un anillo porfirínico que enlaza la molécula O₂ y permite que esta proteína sea la encargada de suministrar oxígeno a las células de los organismos superiores. Sin embargo, las MTs son únicas entre las metaloproteínas, no sólo por la diversidad de iones metálicos que pueden coordinar tanto *in vivo* como *in vitro*,³⁸ sino porque también se les han atribuido una gran variedad de funciones. En estudios *in vitro* éstas son capaces de coordinar metales como Ag(I),³⁹ As(III),⁵ Au(I), Bi(III) Cd(II),⁴⁰ Cu(I), Co(II), Fe(II), Hg(II),⁴¹ Ni(II), Pb(II),⁴² Po, Pt(II) y Tc(IV).⁴³

1.2. Estructura y reactividad

Como ya se ha dicho anteriormente, la estructura primaria de las MTs tiene un alto contenido en Cys, normalmente repartidas a lo largo de toda la secuencia.¹² Estas cisteínas coordinan los iones metálicos formando agregados metal-tiolato en los que se pueden encontrar, tanto S_{Cys} formando puente entre dos centros metálicos y/o como ligandos terminales, siendo éstas unas características comunes en todas las metalotioneínas.^{44,45}

Cabe indicar que las MTs, cuando no coordinan ningún metal (apo-MT) presentan una estructura predominantemente desordenada (lo que se ha denominado *random coil*),⁴⁶ que las hace vulnerable a la proteólisis.⁴⁷ Consecuentemente, la estructura terciaria de la proteína metalada (holo-MT) está determinada por la forma en que la cadena peptídica se pliega, de manera que los residuos de Cys puedan adoptar una disposición espacial adecuada para satisfacer la geometría de coordinación de los iones metálicos, sin producir tensiones en la conformación de la proteína. La estructura terciaria de las MTs no depende únicamente del metal coordinado y sus preferencias de coordinación, sino que también depende del número de metales enlazados y de Cys y la posición de éstas en la cadena peptídica.

Entre las diferentes estructuras tridimensionales determinadas, tanto por rayos-X como por RMN, se han resuelto dos tipos de MTs en base al número de dominios: a) las MTs bidominales (Fig. 2A), en las que los iones metálicos están dispuestos en dos dominios más o menos independientes, como en los mamíferos (dominios α y β); y b) las MTs monodominiales (Fig. 2B), donde los iones metálicos dan lugar a un único clúster, como sucede en MTs más cortas que las de mamífero, como en las de levaduras, hongos o bacterias.⁴⁵

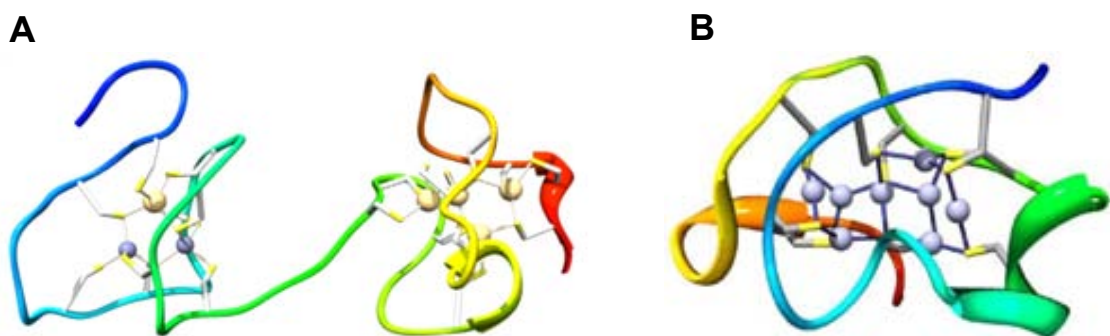


Figura 2. Estructura 3D de: **(A)** Cd₇-MT₂ de humano que muestra sus dominios: α , clúster Cd₄(SCys)₁₁ y β , el clúster Cd₃(SCys)₉; **(B)** MT de la levadura de *S. cerevisiae*, Cup1, mostrando un sólo dominio con un clúster Cu₈-(SCys)₁₀. (PDB entrada 1rju). Los iones Cu(I) se muestran como esferas, los residuos de Cys como palos y los enlaces S-Cu como líneas sólidas.⁴

Se ha demostrado que tanto los requisitos estructurales de los iones metálicos (determinados por el tipo de coordinación presente), como las restricciones estéricas de la estructura de la proteína, determinan la diversidad de las estructuras metal-tiolato que tienen lugar en las MTs, como por ejemplo, se pueden observar pequeñas variaciones entre las estructuras de Zn₇- y Cd₇-MT₂, debido a la diferencia en los volúmenes del clúster (aprox. 20%).⁴⁸

Por otra parte, en los estudios estructurales con Cu, éste se une fácilmente a las MTs *in vivo* e *in vitro*.³⁸ En los seres humanos, tanto la enfermedad de Wilson como la de Menkes son causadas por fallos innatos del metabolismo del Cu, en donde el exceso de este metal se acumula intracelularmente en las MTs. En todos los estudios, el cobre se une a la MT como Cu(I). Un primer estudio por RMN de la isoforma Cup1 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mostró una estructura Cu₇-Cup1,^{49, 50} pero finalmente de la resolución de la estructura cristalina 3D de Cu-MT se obtuvo la especie Cu₈-MT.⁵¹ Esta estructura oligonuclear consta de 6 iones Cu(I) coordinados de forma trigonal y 2 en digonal.⁵¹ Sin embargo, en las MTs de mamífero se observó que cuando están en presencia de Cu, enlazan a 12 de éstos iones formando dos clústeres independientes Cu₆-tiolato, coordinados por dos o tres ligandos de Cys, de manera diferente con los iones metálicos divalentes.^{7,52}

Así como se ha señalado que la coordinación metálica en las MTs de mamífero viene dada por parte de las cisteínas, también se ha reportado la participación de las histidinas (His) en otras MTs. Los residuos de His se han encontrado en una variedad de secuencias de metalotioneínas, incluidas las de bacterias,^{53,54} de levaduras como son Crs5⁵⁵ y Cup1, Zym1 (de la levadura de fisión),⁵⁶ del mejillón MTL-1 y MTL-2 (*C. elegans*),^{57,58} y muchas metalotioneínas de plantas, especialmente las isoformas de MT3 específicas de la fruta,⁵⁴ entre otras, la mayoría de las cuales mediante estudios de espectroscopía (DC y UV-vis) y espectrometría de masas sugieren la coordinación del metal por este aminoácido.^{54,59} El primer ejemplo que evidencia la participación de la His en la coordinación metálica (Zn(II) y Cd(II)) se produjo en la MT de la cianobacteria *Synechococcus* PCC7942, SmtA, donde dos His coordinan en el clúster Zn₄-SmtA.⁶⁰ De manera similar, la estructura 3D del trigo Zn₆-Ec-1 (*T. aestivum*) muestra un sitio de unión ZnCys₂His₂.⁶¹

En relación a la reactividad de las MTs, éstas son metaloproteínas inusualmente reactivas debido al alto contenido en Cys, que les confiere una elevada y diversa reactividad. Como ya se ha dicho anteriormente, la gran capacidad que tienen estas MTs por enlazar diferentes iones metálicos les permite fácilmente participar en reacciones de intercambio e incorporación de metales.⁶² La afinidad de estos iones metálicos por los sitios de coordinación en las MTs sigue el mismo orden observado en los tiolatos metálicos: Hg(II) > Ag(I) ~ Au(I) > Cu(I) > Cd(II) > Pb(II) > Co(II) ~ Zn(II) ~

Fe(II),⁶³ de manera que cualquier ión puede ser desplazado por otro de mayor afinidad.^{14,16,25}

Además, como consecuencia de las propiedades dinámicas de la estructura proteica, algunos de los complejos formados pueden ser muy lábiles cinéticamente, de manera que los ligandos tiolato son capaces de experimentar procesos rápidos de metalación y desmetalación.⁶⁴

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que la Zn₇-MT2 es capaz de transferir un ión Zn(II) a las apoenzimas que poseen una afinidad menor.^{65,66} También se ha confirmado la presencia de un ión metálico unido débilmente a la estructura de Zn₇-MT1 que sería el responsable de iniciar esta transferencia metálica.⁶⁷

Una característica de la reactividad de las MTs es que mantienen un grado de carácter nucleofílico (nucleofilicidad) que se ha visto en la apo-MT,⁶⁸ incluso teniendo los grupos tiol en la proteína enmascarados a través de su interacción con los iones metálicos.

Por otra parte, se ha demostrado que los dominios de aquellas MTs que son bidominales pueden tener reactividades diferenciales. Diferentes estudios (cinéticos, espectrometría de masas y RMN) han señalado que la reacción de las MTs de mamífero con electrófilos puede estar localizada en el dominio α o en el β en función del electrófilo seleccionado. Por ejemplo, se ha encontrado que la yodoacetamida y el p-(hidroximercurio)benzoato de metilo reaccionan preferentemente con el dominio β , mientras que el DTNB, aurótio malato, melfalán o clorambucil reaccionan preferentemente con el dominio α .^{69,70,71}

Otro aspecto interesante de las MTs es su capacidad para reaccionar con especies radicalarias. Esta reactividad se debe principalmente a la capacidad de los residuos de Cys a oxidarse de manera reversible, formando puentes disulfuros, que son fácilmente regenerables en presencia de otra molécula que contenga un grupo tiol en su forma reducida, como el glutatión. Así, se ha demostrado que las MTs de mamífero (M₇-MT, M=Zn(II) y/o Cd(II)) eliminan de manera eficaz los radicales libres, tales como hidroxilo (OH \cdot), superóxido (O₂ \cdot^-) o el óxido nítrico (NO \cdot), que habitualmente se generan en situaciones de estrés oxidativo.^{72,73,74} Los ataques de los radicales libres se producen en los tio latos enlazados al metal, que conducen a la oxidación de la proteína y la consecuente liberación del metal. En muchos casos, estos efectos pueden revertirse bajo condiciones reductoras y en presencia del ión metálico apropiado. El efecto protector de las isoformas de MT frente a los daños de los radicales libres en los sistemas biológicos parece estar relacionado con el papel de las MTs en la prevención o el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer⁷⁵ (EA) o de Parkinson⁷⁶ (EP).

En resumen, se puede considerar que la reactividad de la MT marca de manera muy clara las funciones que pueden desempeñar y está dominada por la química de los grupos tiolato (nucleófilos).

1.3. Papel de las metalotioneínas en el metabolismo de los metales esenciales y tóxicos

Como ya se ha dicho anteriormente, la mayoría de las funciones atribuidas a las MTs son consecuencia directa de su reactividad. Si bien su función fisiológica principal aún no se ha establecido,³⁸ en el medio biológico las metalotioneínas cumplen varios papeles, especialmente en el metabolismo y la cinética de los metales.⁷⁷ Algunos de éstos que se les han atribuido son:

- Homeostasis de Zn(II) y Cu(I)^{78,79}
- Metabolismo de los iones metálicos esenciales^{80,81,82}
- Transporte y almacenamiento de iones metálicos
- Detoxificación de iones metálicos pesados (como Cd(II),¹⁵ Hg(II), Ag(I), etc.)^{12,83}
- Captación de radicales libres
- Protección celular en condiciones de estrés oxidativo⁷⁹
- Regulación metabólica de la producción de energía
- Participación en la respuesta inmune
- Genotoxicidad y carcinogenicidad

Las metalotioneínas desempeñan un papel fundamental en la homeostasis metálica y en los mecanismos de detoxificación.^{13,14} Los mecanismos por los que las MTs protegen a las células de la toxicidad incluyen la unión de metales a las proteínas, disminuyendo así su biodisponibilidad, y la localización en la célula, evitando así la dispersión de los mismos. La concentración intracelular de MTs se ajusta a la demanda celular, controlada a nivel de genoma, y especialmente la transcripción de genes que producen MTs está generalmente inducida por metales pesados.^{13,14,15,16,84,85,86} No solamente los metales habituales, como Zn, Cu o Cd, sino en presencia de metales de alta tecnología, como Ga, Ge, In, Sb, Te, Y, Nb, Tl, Bi y algunos más recientes, introducidos en compuestos usados en superconductores como son óxido de itrio-bario-cobre (YBCO) y $\text{Bi}_2\text{Sr}_2\text{Ca}_2\text{Cu}_3\text{O}_{10}$ (BSCCO). Además, se observó que los contenidos de Bi y Cu pueden inducir la síntesis de MT para formar Bi-MT y Cu-MT.⁸⁷

Otra función importante de la metalotioneína es el mecanismo de defensa celular. Por una parte, la MT, como ya se comentó anteriormente, es capaz de captar los

radicales libres, donde la metionina (Met) podría servir como posible captador, evitando así el efecto nocivo de los mismos.^{88,89} Por otra parte, la MT puede proteger el ADN secuestrando el Cu(I/II) que se pueda encontrar libre en el medio intracelular y así prevenir su participación en las reacciones redox y por lo tanto, inhibir la formación de radicales libres.⁹⁰

Además de su participación en el transporte y almacenamiento de metales, la MT actúa como un donador de Zn cuando es requerido al activarse la respuesta inmune de los organismos. Lo más probable es que también las MTs estén implicadas en los procesos de genotoxicidad y carcinogenicidad. Varios trabajos han indicado que las MTs pueden jugar un papel significativo en los procesos cancerígenos y apoptosis de algunos tumores.^{91,92}

En resumen, hay evidencias experimentales que indican que, además de importantes funciones intracelulares (como la homeostasis de metales y la protección contra el estrés oxidativo) y extracelulares, las MTs tienen un papel relevante en la regulación de la función celular, incluyendo la diferenciación neuronal, la supervivencia y la respuesta inmune.

1.4. Clasificación de las metalotioneínas

Las metalotioneínas se han clasificado, de forma tradicional desde 1987,⁹³ en base a su homología secuencial con la MT1 de riñón de caballo, en tres clases, la primera descubierta:

Clase I: de elevada homología con la MT1 de caballo, tienen 60-62 aa entre los cuales unos 20 son Cys. Su estructura terciaria se supone que está formada por dos dominios y comprenden las MTs de vertebrados, crustáceos y algunos moluscos.

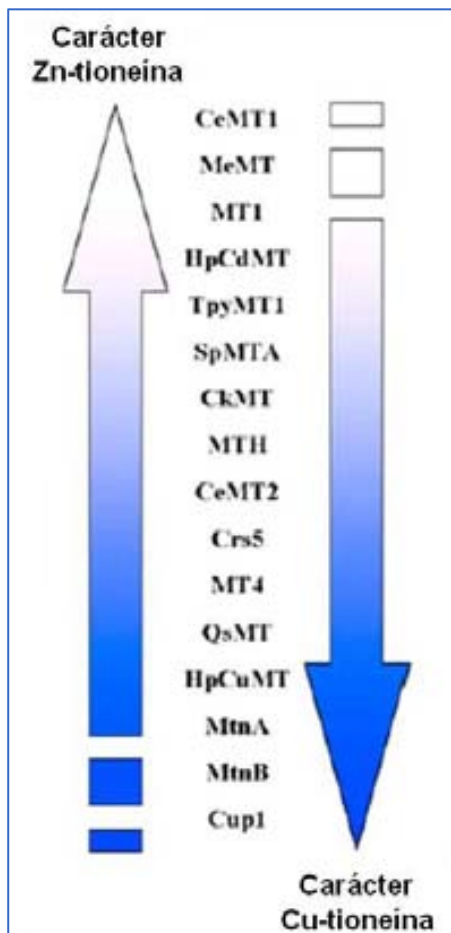
Clase II: muestran longitud y número de Cys variable, no son homólogas a la MT1 de mamífero, ni entre ellas, acostumbran a mostrar una estructura monodominio y se encuentran en levaduras, hongos y otros organismos inferiores.

Clase III: son polipéptidos de síntesis enzimática y estructura γ -[Glu-Cys]_n-Gly que se encuentran en algunas levaduras, plantas y hongos. Se denominan fitoquelatinas y cadistidinas.

Posteriormente, se propuso otra clasificación²⁴ que divide las MTs en familias, subfamilias, subgrupos, isoformas y subisoformas, pero ésta da lugar a tantas familias como órdenes existentes en los reinos animal y vegetal.

Recientemente, y teniendo en cuenta que ninguna de las dos clasificaciones mencionadas anteriormente proporcionan información funcional o evolutiva de las MTs, sino que se basan en la similitud secuencial, el grupo de investigación donde se enmarca esta Tesis Doctoral propuso una nueva clasificación considerando criterios

funcionales.^{37,94} Ésta se basa en las preferencias de las MTs para coordinar los iones metálicos esenciales Zn(II) y Cu(I) *in vivo*. Como la estructura de las MTs viene determinada por la coordinación metálica, y teniendo en cuenta, por un lado la relación estructura/función, y por otro, las diferentes propiedades coordinantes de Zn(II) y Cu(I), se clasificaron las MTs en dos familias:



-Zn-tioneínas: aquellas que en medios ricos en Zn(II) se expresan como especies homometálicas Zn-MT, mientras que en medios ricos de Cu dan lugar a especies heterometálicas Zn,Cu-MT.

-Cu-tioneínas: aquellas que en medios ricos de Cu(I) se expresan como especies homometálicas Cu-MT, y por tanto, no necesitan Zn para estructurarse.

Posteriormente, después de analizar un gran número de MTs diferentes de diversos organismos, se propuso que todas las MTs conocidas pueden mostrar distintos grados de afinidad por Zn(II) y/o Cu(I), de manera que se definió una gradación entre el carácter genuino de Zn - o de Cu-tioneína.⁹⁵ (Fig. 3)

Figura 3. Esquema de la gradación de las preferencias de unión metálicas frente al Zn(II) y Cu(I) de las MTs de diversos organismos, mostrando su clasificación que va desde una Zn-tioneína genuina hasta el extremo de Cu-tioneína genuina.⁹⁵

2. Metalotioneínas de mamífero

Las MTs de mamífero han sido largamente estudiadas debido a que fueron las primeras descubiertas y a su facilidad de obtención a partir de tejidos animales, proporcionando que hoy en día se tenga un amplio conocimiento de estas proteínas. Así, en la literatura se encuentra una gran variedad de trabajos tanto biológicos (purificación, patrones de expresión, estudios genéticos, etc.) como químicos (capacidad coordinante frente a diferentes metales, caracterización de los agregados metálicos formados, reactividad, estructuración, etc.) referentes a las MTs de mamífero.^{96,97,98,99,100}

Actualmente está ampliamente aceptado que existen cuatro isoformas de MTs de mamífero: MT1, MT2, MT3 y MT4, además de un gran número de subisoformas, que se

caracterizan por tener una cadena polipeptídica que contiene 20 residuos de cisteína de un total de 60-61 aa (excepto MT3, que tiene 68 residuos) en donde en el extremo N-terminal hay una Met y en el C-terminal a menudo es una alanina (Ala) (con excepción de MT3-glutamina(Gln) y MT4-prolina(Pro)) (véase Fig. 4).

Las cuatro isoformas presentan las 20 Cys en posiciones totalmente conservadas con secuencias particulares como: Cys-X-Cys-Y, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, donde X e Y representan otros aa diferentes a las cisteínas (Fig. 4).¹⁰¹ Además de compartir la ausencia de aa aromáticos, también tienen una elevada similitud en el resto de la secuencia. No obstante, existen diferencias importantes en cuanto a los patrones de expresión; mientras que MT1 y MT2 se sintetizan ubicuamente,^{102,103} en contraste MT3 y MT4 presentan expresiones específicas, encontrándose específicamente en el sistema nervioso central¹⁰⁴ y en el epitelio escamoso estratificado,¹⁸ respectivamente.¹⁰⁵

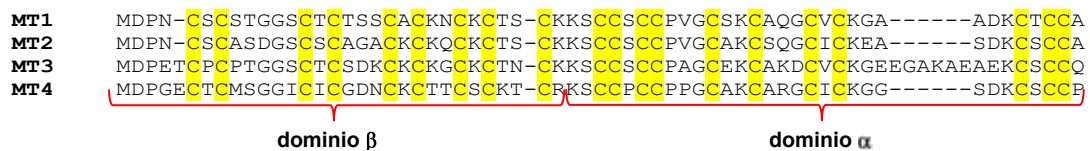


Figura 4. Alineación de las secuencias de las isoformas recombinantes de MT de mamífero: MT1, MT2, MT3 y MT4, indicando los dominios α y β de cada una de ellas.

En relación a su estructura, todas las MTs de mamífero hasta ahora estudiadas tienen una forma monomérica de pesa (“*dumbbell shape*”), compuesta de dos clústeres metálicos, que están conectados por una región flexible de una conservada secuencia Lys-Lys que actúa como una bisagra en el medio de la cadena polipeptídica. El dominio β (N-terminal) enlaza 3 iones metálicos divalentes y el dominio α (C-terminal) enlaza 4 iones divalentes (véase Fig. 2).⁴⁴ Se supone que el dominio β puede regular la homeostasis de Zn(II) y Cu(I), mientras que el dominio α puede jugar un papel especial en la detoxificación de metales pesados.¹⁰⁶ El contenido metálico de Zn(II), Cd(II), Hg(II) o Cu(I) puede variar en función de las condiciones fisiológicas, llegando a constituir hasta el 11% del peso de la MT.^{107,108}

A continuación se detallarán las características más relevantes, tanto estructurales como funcionales de cada MT. Como MT1 es la MT más estudiada, y debido a las similitudes de secuencias con MT2, se ha supuesto desde el principio que el comportamiento descrito para MT1 puede ser extensivo a MT2, si bien hay cada vez más evidencias que ponen en entredicho esta similitud de comportamiento.⁹⁶ Respecto a la isoforma MT3, se han publicado algunos trabajos que destacan su posible función en el sistema nervioso central,^{109, 110, 111, 112} mientras que sobre la isoforma MT4 la información de que se dispone actualmente es muy reducida.^{18,97,105}

2.1. MT1 y MT2

2.1.1. Características relevantes

Las isoformas MT1 y MT2 de mamífero tienen secuencias de aminoácidos muy similares (sólo difieren en seis de éstos) (Fig. 4), conteniendo 61 (6162.23 Da) y 62 (6259.35 Da) aa, respectivamente.⁹⁶

Debido a que se encuentran en prácticamente todas las células de los organismos y en todas las etapas del desarrollo celular, se ha sugerido que MT1 y MT2 pueden tener varias de las funciones biológicas descritas anteriormente.^{14,24,110,113} Entre otras, se ha demostrado que el gen que expresa MT2 es un gen neuroprotector en la isquemia cerebral.^{114,115}

En cuanto a la regulación de estas MTs, en general se acepta que la expresión de MT1 y MT2 es altamente inducible por una serie de estímulos, incluyendo los metales, hormonas, citoquinas, inflamación y estrés.¹¹⁶ En los seres humanos, los metales inducen la expresión de todas las subisoformas de MT1 y MT2, mientras que las únicas inducidas por glucocorticoides son MT1E y MT2A.¹¹⁷

Respecto a su clasificación, los resultados obtenidos por este grupo de investigación muestran que MT1 y su dominio α presentan carácter de Zn-tioneína,⁹⁴ por lo que necesitan Zn para replicarse, y en cambio el dominio β se comporta aisladamente como una Cu-tioneína.¹¹⁸ De acuerdo con los datos bibliográficos obtenidos a partir de proteínas nativas,¹¹⁹ cuando MT1 se expresa en medios ricos en Zn se obtiene la especie Zn₇-MT1, donde los iones Zn(II) pueden ser sustituidos por Cd(II) para dar el agregado isoestructural Cd₇-MT1.^{120,121} En cambio, la proteína en medios ricos en Cu(I) se expresa como Cu₇Zn₃-MT1, con una distribución entre dominios de Cu₃Zn₂- α MT1 y Cu₄Zn₁- β MT1.¹²² Por su parte, los resultados obtenidos recientemente, demuestran que MT2 tiene un carácter de Zn-tioneína más marcada que MT1, por lo que se explicaría algunas de las diferencias observadas en su reactividad.⁹⁶

2.1.2. Antecedentes estructurales

A partir de los estudios de RMN ¹¹³Cd de la reconstituida ¹¹³Cd₇-MT2¹²³ se obtuvo la primera evidencia de la existencia de los clústeres metal-tiolato en las MTs. Estos estudios revelaron que los 20 residuos de cisteína participan en la coordinación de 7 iones metálicos divalentes (Cd(II) y Zn(II)) que se distribuyen entre: el dominio β (1-31 aa) que contiene el clúster M(II)₃(SCys)₉ y el dominio α (32-62 aa) un agregado M(II)₄(SCys)₁₁ (Fig. 2 y Fig. 6.). En estos fragmentos, los iones metálicos están coordinados por ligandos tiolato, tanto terminales como puentes, en una geometría de tipo tetraédrica.¹²⁴

Así también, las estructuras de MT1 y MT2 de diversos organismos han sido determinadas tanto por espectroscopía de RMN,^{125,126,127,128} como por cristalografía de rayos X (Fig. 5),^{48,129} mostrando el monómero en forma de pesa de los dos dominios, y con un plegamiento para MT1 y MT2 prácticamente análogos.

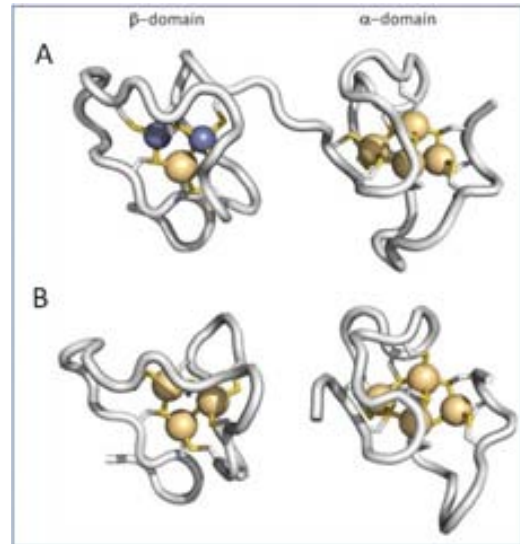


Figure 5. Estructura 3D de MT2 de ratón fue determinada (a) por cristalografía de rayos X,¹²⁶ $\text{Cd}_5\text{Zn}_2\text{-MT2}$ y (b) por RMN en solución acuosa,¹²⁹ $^{113}\text{Cd}_7\text{-MT2}$. Los metales se muestran como esferas conectadas por ligandos tiolato de cisteína a la cadena polipeptídica de la proteína.⁴⁵

A su vez, la flexibilidad de la estructura de la cadena polipeptídica que envuelve el núcleo metálico en MT1 y MT2 está bien documentada, indicando que existe un considerable grado de desorden estructural dinámico.^{126,127,128,129}

En estos estudios, se demostró que en ambas isoformas la flexibilidad es mayor en el dominio β , que está menos restringido estructuralmente que el dominio α . Así también, se mostró que en βMT2 los bucles de polipéptidos entre ligandos de cisteína presentan una extraordinaria plasticidad sin alterar la geometría del clúster de 3 metales.¹³⁰ Debido precisamente a la elasticidad de estos bucles entre cisteínas, es que en general, se supone que las MTs pueden acomodar una amplia variedad de iones metálicos divalentes de diferentes tamaños sin ninguna selectividad.

No obstante, diversos estudios han demostrado que MT1 y MT2 poseen una selectividad apreciable en la distribución de los iones metálicos coordinados entre los clústeres formados e incluso en las posiciones dentro de cada clúster.^{131,132} Estos resultados son opuestos a los obtenidos en los estudios inorgánicos de ligandos tiolato monodentados de fórmula $[\text{M}_4(\text{SPh})_{10}]^{2-}$ ($\text{M}=\text{Cd}(\text{II}), \text{Zn}(\text{II}), \text{Co}(\text{II}), \text{Fe}(\text{II})$), donde a pesar de las diferencias en afinidades del metal-tiolato y en los volúmenes del clúster homometálico, siempre se produjeron complejos heterometálicos con una distribución prácticamente estadística de los iones metálicos.¹³³ Puesto que los mismos iones metálicos fueron empleados en los estudios de MT1 y MT2, esto reveló que las propiedades de la estructura de la MT son responsables de este efecto.

Adicionalmente, los estudios de RMN revelaron que la formación de ambos clústeres en Cd₇-MT2 tiene lugar de forma cooperativa y secuencial, primero formando el clúster de 4 metales del dominio α .¹³⁴ Aunque en la especie Zn₇-MT2 cada uno de los 7 iones Zn(II) se unen en un entorno de coordinación tetraédrico, el análisis de la unión de Zn(II) a la MT2 mostró al menos tres tipos de sitios de unión, con afinidades que difieren en cuatro órdenes de magnitud.⁶⁷

2.1.3. Aspectos funcionales de MT1 y MT2

La mayoría de las funciones propuestas para las MTs se basan, en su gran totalidad, en las observaciones realizadas para MT1 y MT2 de mamífero, por lo tanto, aquellas descritas en apartados anteriores se las puede asociar a estas dos isoformas, teniendo en cuenta que también se encuentran en todo tipo de células.

Generalmente se considera que MT1 y MT2 tienen un papel en la homeostasis metálica de Zn(II) y Cu(I), así como en la toxicidad de metales pesados (principalmente Cd(II) y Hg(II)).¹⁶ Si bien intracelularmente MT1 y MT2 se encuentran comúnmente enlazando Cu(I) y sobre todo Zn(II), también se ha propuesto la presencia de la apo-MT en las células¹³⁵ y los tejidos.¹³⁶ El fácil desplazamiento de los iones Zn(II) en estas MTs en presencia de Cd(II) o Hg(II), sugiere que al menos al principio MT1 y MT2 pueden coordinar el exceso de metal presente. Sin embargo, el desplazamiento de Zn(II) hace aumentar el número de Zn libre en la célula, lo que contribuye a disminuir la citotoxicidad del metal tóxico,¹³⁷ por lo que sería igualmente importante una nueva producción de MT1 y MT2 (en forma de apo-MT).

Por otro lado, el potencial redox del metal enlazado a MT1 y MT2, en el caso de Zn-MT1/2 es bajo, lo que significa que oxidantes biológicos leves pueden liberar Zn a partir de la proteína.^{138, 139} Mientras que, los metales tales como Cd y Cu se unen significativamente más fuerte que el Zn a MT1/2, también se liberan fácilmente por la acción de oxidación del ligando azufre.^{140,141} Esto sugeriría que bajo condiciones de estrés oxidativo, MT1 y MT2 pueden no ser eficaces en el mantenimiento de la homeostasis de metales pesados.

El primer estudio que sugirió que MT1 y MT2 podrían considerarse como antioxidantes celulares fue publicado en 1982,¹⁴² demostró que la resistencia a la radiación fue provista por altos niveles de MT1/2 en células cultivadas. Además, muchos estudios confirmaron que las MTs pueden reaccionar y ser eficientes depósitos de radicales libres (OH \cdot y O₂ \cdot^-),⁷² y desde un punto de vista fisiológico, lo más notable es que la mayoría de las condiciones prooxidantes inducirán la síntesis de MT1 y MT2, destacando aún más el papel de estas proteínas en la respuesta del huésped al estrés oxidativo.^{143,144}

Otros numerosos estudios *in vitro*, *in vivo* y con humanos han demostrado acciones antiapoptóticas de MT1 y MT2, aunque los mecanismos actuales de acción aún no se han aclarado completamente.^{145,146,147,148,149,150}

Además, se propone que la MT puede actuar como un intermediario en la respuesta inmune al estrés inducido. Por ejemplo, la expresión de MT1 y MT2 puede ser inducida por un número de citoquinas de fase aguda.^{151,152,153,154,155} Además, se ha observado que las MTs pueden interactuar directamente con la membrana plasmática de las células inmunes.^{156,157}

Por último, se sabe que MT1 y MT2 se pueden detectar en el entorno extracelular *in vivo*,^{158,159,160} y son secretadas activamente por adipositos.¹⁶¹ Así también, hay estudios sobre el papel extracelular de la MT modulando la función celular,¹⁷ que informan que MT1 y MT2 promueven la extensión de neuritas corticales¹⁶² y las neuronas dopaminérgicas.¹⁴⁵

2.2. MT3

2.2.1. Características relevantes

La isoforma MT3 es la más grande de las cuatro MTs de mamífero, con 68 aa (7153.34 Da), si bien su estructura primaria es similar a MT1 y MT2, con un 70% de identidad secuencial, incluyendo la matriz conservada de 20 residuos de cisteína. En comparación con las secuencias de aa de MT1, MT2 y MT4, la secuencia de MT3 muestra dos insertos; seis ácidos glutámicos insertados en el dominio α (C-terminal, residuos 32-68) y una treonina en la 5ª posición en la región del dominio β (N-terminal, residuos 1-31) seguido por un motivo conservado C₆-PC-P₉.

La secuencia de aminoácidos de MT3 está muy conservada entre los diferentes mamíferos conocidos (Fig. 6).

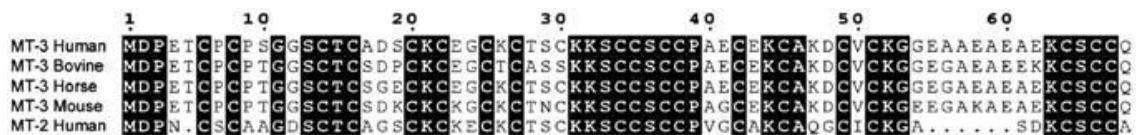


Figura 6. Secuencia de aminoácidos de alineación de las isoformas MT3 de cuatro especies de mamíferos diferentes en comparación con la secuencia humana de MT2 con los residuos conservados destacados. La figura se ha generado con el programa ESPrift versión 2.2.¹⁶³

Esta metalotioneína se encontró en abundancia en el tejido cerebral humano.¹⁶⁴ El aparente aumento de la actividad neurotrófica se encontró que era debido a la pérdida de un factor inhibidor del crecimiento neuronal (GIF), que posteriormente se identificó como la isoforma MT3.¹⁷ La aparición de esta metalotioneína en el tejido que crece en los tumores fue reportado por Cherian.¹⁶⁵ Hasta el momento, esta es la única MT que

tiene una función relacionada con el crecimiento. El gen *GIF/MT3*, como otros genes que codifican MT, se encuentra en el cromosoma 16 en humanos. La expresión de MT3 no está regulada por los metales, por lo que no es inducible por Cd como lo son MT1 y MT2.

En contraste con las isoformas MT1 y MT2, ampliamente expresadas en casi todos los órganos por lo general conteniendo sólo iones Zn(II), MT3 se expresa principalmente en el sistema nervioso central (SNC), el cerebro y predominantemente en neuronas.¹⁶⁶ Cuando MT3 es aislada de cerebros bovinos o humanos contiene iones de Cu(I) y Zn(II).^{113,17} Una serie de estudios revelaron que MT3 posee propiedades estructurales peculiares que no se encuentran en las isoformas MT1 y MT2, que son responsables de su distinta actividad biológica.

Las evidencias experimentales sugieren que MT3 está implicada en la homeostasis de cobre y zinc en el SNC. Recientemente, su papel en la protección celular de procesos patológicos que ocurren después de la lesión cerebral y en un número de trastornos neurodegenerativos ha recibido una atención particular. Las concentraciones de esta MT medidas por el método de saturación de Cd muestran una dependencia clara con la edad, mostrando una disminución de ésta, como también se ha observado que la concentración de MT3 es claramente inferior en personas con la EA.¹⁷

La isoforma MT3 todavía no ha sido clasificada como Zn- o Cu-tioneína, pero estudios previos de este grupo de investigación proponen un carácter más próximo a una Cu-tioneína, al igual que su dominio β y al contrario, su dominio α tiene un carácter más cercano a una Zn-tioneína.¹⁶⁷

2.2.2. Antecedentes estructurales

a. Estructura de MT3 con iones metálicos divalentes (Cd y Zn)

Como se dijo anteriormente, la estructura de las MTs se determina por la interacción entre la cadena polipeptídica y los iones metálicos. En este sentido, la estructura de las agrupaciones metal-tiolato formadas juega un papel importante en el pliegue final del polipéptido. A partir de las investigaciones espectroscópicas de la proteína recombinante y síntesis química de los dominios individuales de la proteína se obtuvo información estructural de los clústeres metal-tiolato de Zn₇-MT3 y Cd₇-MT3 estableciendo la presencia de dos dominios de proteínas que interactúan mutuamente, asemejándose a los reportados para MT1 y MT2, donde cada dominio abarca un conjunto metal-tiolato.^{168, 169, 170, 171} Por lo que M(II)₇-MT3 presenta un clúster de 3 metales en el dominio β y otro de 4 metales en el dominio α (Fig. 7).^{169,170} Mientras que la proteína libre de metal (apo-MT3) posee una estructura predominantemente desordenada, y desarrolla una estructura bien definida tras la unión del metal. Sobre la

base de datos de la estructura de absorción de rayos X (EXAFS) de Zn_7 -MT3, se observó que los 7 iones $Zn(II)$ están coordinados tetraédricamente por ligandos tiolato terminales y puentes.

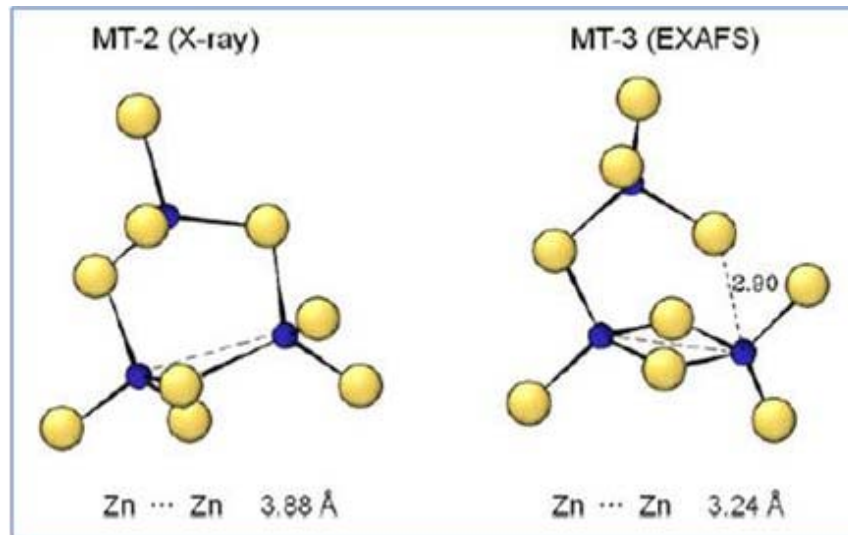


Figura 7. Propuesta del modelo estructural del clúster $Zn_3(Cys)_9$ en Zn_7 -MT3 (derecha) en comparación con el clúster $Zn_3(Cys)_9$ similar a un ciclohexano presente M_7 -MT2 (izquierda). Los iones metálicos se muestran como bolas y los tiolatos de cisteína como esferas sombreadas.¹⁶⁸

Los estudios de RMN (3D) de la estructura de Cd_7 -MT3 de ratón y humano han demostrado^{109,171} que, los dos dominios están conectados por una región flexible (bisagra) de una conservada secuencia Lys-Lys en el medio de la cadena polipeptídica (Fig. 8). Sin embargo, debido a procesos dinámicos en el dominio β , sólo se pudo determinar la estructura 3D por RMN del dominio α que contiene como clúster Cd_4Cys_{11} .^{109,171} La estructura de este dominio muestra un pliegue y una organización en agrupaciones del péptido muy similares a los encontrados en el dominio α de la Cd_7 -MT1/2, con la excepción de un bucle extendido flexible que abarca el inserto ácido hexapéptido.¹²⁷

Los estudios de ^{113}Cd -RMN del dominio β de Cd_7 -MT3¹⁷² muestran la presencia de 3 centros metálicos y se han identificado procesos dinámicos, que incluyen la ruptura temporal y la transformación de los enlaces $Cd-S$ dentro del clúster Cd_3Cys_9 , hecho que no se ha observado en las homólogas Cd_7 -MT1/2.¹⁷¹ Se ha encontrado que el motivo conservado $T_5-C-P-C-P_9$ en el dominio β es esencial para la bioactividad y la dinámica del clúster de tres metales,¹⁷³ por lo que la mutación de los residuos conservados de Pro en este motivo por Ala y Ser, los aa presentes en MT2, suprimió la actividad neuroinhibitoria y la dinámica del clúster.^{174,175} Por lo tanto, las diferencias estructurales en la secuencia primaria de MT3, en comparación con MT1/2, puede ser las responsables de las variaciones en la actividad biológica de MT3.¹⁷⁴ En

consecuencia, se ha sugerido que las características estructurales específicas introducidas por los dos residuos de Pro son las únicas responsables de la bioactividad extracelular de Zn₇-MT3.¹⁷⁴

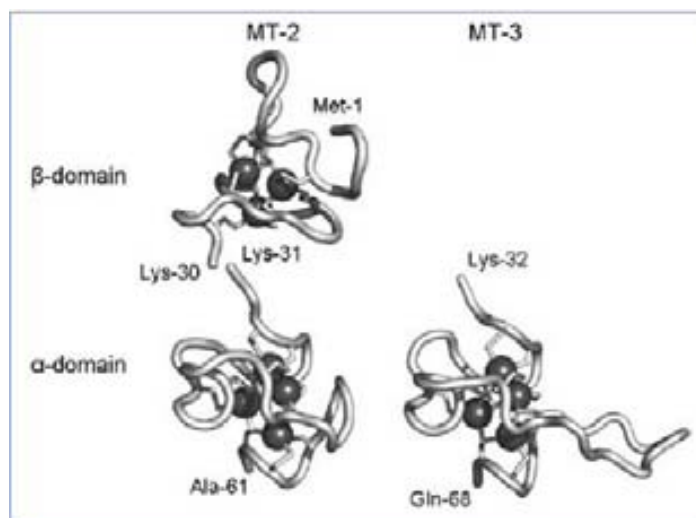


Figura 8. Estructura tridimensional de Cd₇MT2¹⁷⁶ y el dominio α de ¹¹³Cd₇-MT3¹⁷¹ de humano determinado por espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Los iones Cd(II) se muestran como esferas sombreadas conectados a la esqueleto proteico por ligandos tiolato de cisteína. Los modelos se generaron con el programa PyMOL v0.99 (<http://www.delanoscientific.com/>).

Como resultado de estas propiedades estructurales, la afinidad de unión metálica de MT3 hacia iones metálicos divalentes es más débil que MT1 y MT2, siendo las constantes de unión para iones Cd(II) y Zn(II) en MT3 de $2.0 \times 10^{14} \text{M}^{-1}$ y $6.2 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$, respectivamente, mientras que las constantes correspondientes en MT2 son $7.0 \times 10^{14} \text{M}^{-1}$ y $3.1 \times 10^{11} \text{M}^{-1}$.¹⁷⁴ Y a diferencia de lo observado en MT1 y MT2, esta unión metálica a MT3 no es de forma cooperativa,^{177,178} y por lo tanto, debe proceder a través de una vía de plegamiento diferente.^{174,177}

b. Características estructurales de Cu(I) enlazado a MT3

La interacción de Cu(I) con MT3 fue estudiada a través de los experimentos con los dominios sintetizados libres de metal y la proteína entera con unión a Cu(I). Al valorar con Cu(I) ambos dominios sintéticos de MT3 mostraron que durante este proceso se generan dos formas bien definidas de clúster Cu-tiolato. En el caso del dominio β (residuos 1-32), la titulación con iones de Cu(I) resultó en la formación sucesiva de dos tipos de clústeres que implican la coordinación de las 9 Cys: Cu₄S₉ y Cu₆S₉.¹⁶⁹ Estudios similares con el dominio α (residuos 32-68), que contiene 11 ligandos de Cys, dieron lugar a la formación de la agrupación Cu₄S₈₋₉ seguida por el clúster Cu₆S₁₁.¹⁷⁰ A bajas relaciones de Cu(I)/proteína se ha descrito la presencia de dos clústeres diferentes Cu₄-tiolato en ambos dominios de la proteína.¹⁷⁹

También se han llevado a cabo estudios estructurales de MT3 aislada que contienen iones Cu(I) y Zn(II), como Cu₄Zn_{3,4}-MT3. Los estudios de EXAFS sobre esta especie revelaron la presencia de dos grupos homometálicos, un clúster Zn_{3,4}-tiolato y otro Cu₄-tiolato. En contraste con los iones Zn(II) tetraédricamente coordinados, los iones Cu(I) pueden estar coordinados con geometría digonal y/o trigonal por varios ligandos de cisteína.^{113,168} Esta observación, también vista para el complejo Cu₄-tiolato en MT1/2, significa que existen diferentes geometrías de coordinación para la unión de iones metálicos monovalentes y divalentes en MT3. Por lo que MT3 debe poseer una estructura con un alto grado de flexibilidad.¹⁸⁰ para acomodar los clústeres metal-tiolato con diferentes geometrías de coordinación. Hay pruebas que sugieren que el Cu(I) se une preferiblemente al dominio β, menos restringido estructuralmente,¹⁸¹ mientras que Cd(II) y Zn(II) se unen al dominio α.¹⁸²

2.2.3. Reactividad de MT3

Al igual que las otras MTs de mamífero, MT3 muestra una reactividad muy inusual. Aunque la afinidad de los iones metálicos a MT3 sigue el orden Cu(I) > Cd(II) > Zn(II) visto también en MT1/2, la afinidad de Cu(I) a MT3 parece ser significativamente mayor que en MT1 y MT2.¹⁸³ Esta mayor afinidad del ión Cu(I) a MT3 podría estar relacionado con las características estructurales del dominio β en donde el cobre se une de forma preferente.

Estudios sobre el efecto del inserto hexapéptido EAAEAE en el dominio α (Fig. 4) que contiene la secuencia de MT3, señalaron que este inserto, es en parte responsable de hacer más flexible el dominio α. Como consecuencia, se reduce la estabilidad general del clúster metal-tiolato.¹⁸⁴

En relación con la presencia extracelular de MT3, se investigó la reacción de Zn₇-MT3 con Cu(II), demostrando que Zn₇-MT3 fue capaz de secuestrar iones libres Cu(II) a través de su reducción a Cu(I) y unirse a la proteína. En esta reacción los ligandos tiolato se oxidan a disulfuros con la correspondiente liberación de Zn(II). Esto sugiere que Zn₇-MT3, puede silenciar eficientemente la acción redox de los iones Cu(II) libres, desempeñando un importante papel protector de la toxicidad mediada por Cu(II) en el cerebro.¹⁸⁵ Por lo que MT3 limpia eficientemente especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS),¹⁸⁶ por ejemplo podría impedir la generación de ROS a través del ciclo redox de Cu(II), libre o unido anormalmente en una reacción de tipo Fenton, que es perjudicial en un gran número de trastornos neurodegenerativos.¹⁸⁷

Una característica sorprendente encontrada por métodos inmunoquímicos sobre la agrupación Cu₄-tiolato que se localiza en el dominio β del clúster Cu₄Zn₄-MT3,¹¹¹ es su notable estabilidad contra la oxidación del aire. Por el contrario, el clúster Zn₄-SCys₁₁ del

dominio α muestra sensibilidad al aire, oxidándose parcialmente los ligandos tiolato que resulta en la formación de disulfuro y la liberación de Zn(II), dando lugar a un clúster Zn₃-tiolato en el dominio α , formando así Cu₄Zn₃-MT3.¹⁸⁸ Además, por medio de estudios sobre la proteína Cu₄Zn₄-MT3 preparada *in vitro*, se demostró la presencia de un sitio redox de zinc lábil en el clúster Zn₄-tiolato situado en el dominio α .

2.2.4. Función de MT3 en el cerebro

La MT del cerebro, MT3, muestra propiedades biológicas no observadas en MT1 y MT2. Esto está claramente documentado por estudios *in vivo*, realizados en ratones que, cuando sobreexpresan MT3 en la mayoría de órganos, mueren como resultado de una atrofia de páncreas, mientras que la expresión de cantidades similares de MT1 no tiene ningún efecto.¹⁸⁹ Aunque la razón de la toxicidad de MT3 es desconocida, estos resultados proporcionan evidencia biológica de que las isoformas de MT presentan diferentes propiedades funcionales. En general, los estudios *in vivo* demostraron claramente una función biológica diferente para esta proteína endógena.¹⁹⁰

En el SNC, MT3 se expresa en neuronas y astrocitos, en los que parece jugar un papel importante en la homeostasis de cobre y zinc.¹⁰⁹ Aunque MT1/2 también se expresan en los astrocitos, parece ser que sólo se secreta MT3. Esto sugiere que MT3 puede desempeñar una función biológica diferente en el espacio intra-y extracelular.¹⁸⁷ MT3 es también presente en varias regiones del cerebro en diferentes concentraciones, concentrándose particularmente en vesículas presinápticas (las que se encuentran el 10-15% del total de Zn(II) presente en el cerebro), dentro de las neuronas enriquecidas en zinc (ZEN), de la corteza cerebral y el hipocampo.¹⁹¹

La co-localización de MT3 y zinc vesicular en ZEN ha llevado a la sugerencia de que la proteína puede contribuir a la utilización de Zn(II) como un neuromodulador. Ya que MT3 no es necesaria para una protección directa contra Zn(II) o Cd(II) exógenos, puede desempeñar un papel en la protección de las neuronas frente a la toxicidad de zinc, facilitando el transporte de zinc o su manipulación.¹⁹¹ A partir de estos estudios se ha sugerido un rol importante para MT3 en el reciclaje de Zn(II).¹⁶⁶

La función más característica de MT3 es su actividad inhibidora del crecimiento extracelular en cultivos primarios neuronales.¹⁷ La bioactividad descubierta condujo a la hipótesis de que la MT3 podría estar implicada en procesos patogénicos que conducen a la EA. Otros estudios para determinar su papel en la EA mostraron que MT3 protege a las células neuronales del efecto tóxico de β -amiloide (Ab1-40), pero no MT1/2.¹⁹² Sin embargo, estos dos efectos no están funcionalmente relacionados.

Además, MT3 parece ser sintetizada en astrocitos en reposo, siendo, por lo tanto, un estado quiescente específico de la proteína. Sin embargo, su expresión se incrementa

por el factor de crecimiento epidérmico, que estimula las respuestas biológicas tales como la proliferación de los astrocitos y la diferenciación neuronal.¹⁹³ Estos resultados condujeron a la propuesta de que MT3 puede desempeñar un papel en la reparación de daño neuronal mediante la inhibición del anómalo crecimiento neurítico.¹⁹³

Dado que la expresión de MT3 puede ser inducida por el estrés oxidativo en la fase aguda tras la lesión cerebral, también se ha sugerido una función especial para MT3 en la protección contra las especies ROS y RNS.

2.3. MT4

2.3.1. Características relevantes

El último miembro identificado de la familia de las MT de mamífero fue MT4. Esta isoforma se compone de 62 aa (6420.66 Da) de los cuales 20 son Cys (Fig. 4), además muestra un inserto de Glu en la 5ª posición con relación a las proteínas MT1 y MT2.

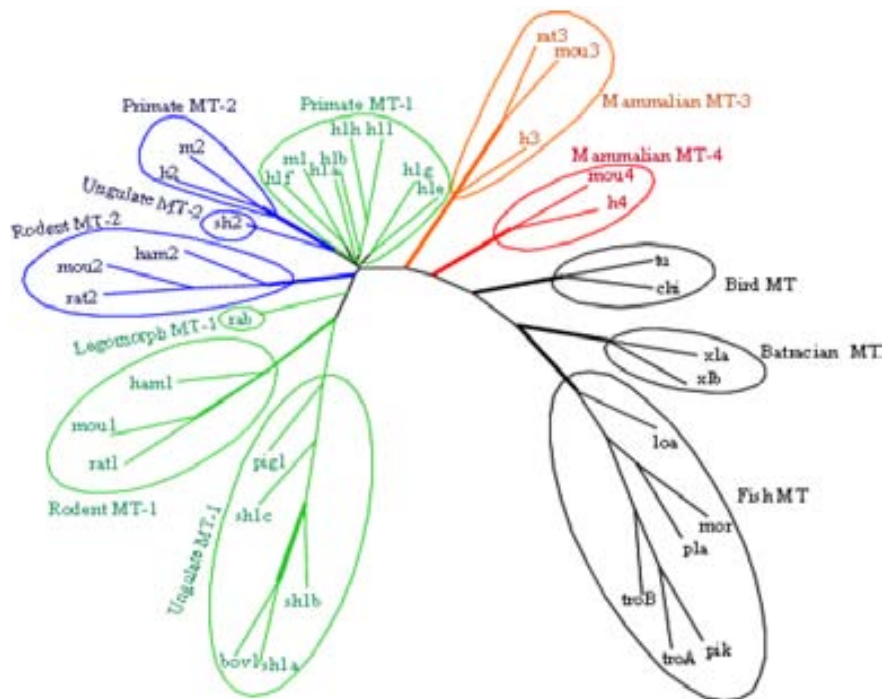


Figura 9. Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias de los exones de MTs de vertebrados.

De todas las MTs de mamífero, MT4 es la que presenta diferencias aminoacídicas más importantes (de sus 62 aa, entre 24 y 27 se diferencian del resto de las isoformas, mientras que para MT3 no más hay 15 diferencias) pero a la vez es la más conservada entre especies diferentes. Esto hace que en los árboles filogenéticos construidos a partir de secuencias codificantes de ADN, MT4 aparece en una posición separada del resto de las MTs de mamífero y más próxima a las MTs de aves (Fig. 9), sugiriendo que MT4 podría ser la MT primitiva de mamífero.¹⁹⁴

MT4 se expresa en células de epitelio escamoso estratificado diferenciadores, tales como la piel, la lengua y el esófago.¹⁸ También se expresa en los queratinocitos.

Los estudios de MT4 sobre biología molecular y perfiles de expresión en los tejidos maternos (la placenta)¹⁰⁵ y durante el desarrollo y la fisiología del epitelio^{18,195} revelaron que el gen *MT4* está sujeto a una estricta regulación del desarrollo. Sin embargo, todavía se discute la cuestión de si MT4 está involucrada en el metabolismo de cobre o zinc en el epitelio.

2.3.2. Antecedentes de la capacidad coordinante, *in vivo* e *in vitro*

Los estudios sobre la capacidad coordinante de MT4 frente a los iones Zn(II), Cd(II) y Cu(I), que consisten en producciones enriquecidas con estos metales y valoraciones *in vitro*,¹⁹⁶ sugieren que esta proteína tiene un comportamiento muy particular.

La capacidad coordinante de MT4 frente a Zn (II) se acerca bastante a la descrita para MT1, ya que ambas proteínas genéricas eran especies únicas en solución de estequiometría idéntica, Zn₇-MT, Zn₄- α MT y Zn₃- β MT, que presentan espectros de DC similares, si bien en el caso de MT4 los tres péptidos estudiados muestran en solución una menor quiralidad que los de MT1. Así entonces, se propone que la coordinación de Zn confiere un menor grado de replegamiento en MT4 que en MT1.

En cuanto a su capacidad frente a Cd(II), sucede que cuando MT4 se sintetiza en medios ricos en Cd únicamente el fragmento α MT4 se expresa como una única especie de estequiometría Cd₄- α MT4, mientras que la proteína entera y β MT4 se expresan como una mezcla de especies entre las cuales se encuentran los complejos homometálicos de Cd(II) esperados, Cd₇-MT4 (es la minoritaria) y Cd₃- β MT4 (especie mayoritaria), juntamente con diversos complejos heterometálicos Zn, Cd-MT, si endo Zn₄Cd₃-MT4 la especie mayoritaria. Este hecho, juntamente con la baja afinidad de la proteína entera por el Cd en comparación con las de sus dominios, denotan que α MT4 y β MT4 se comportan de manera diferente cuando se encuentran aislados que cuando están formando parte de MT4. Por tanto, se propone que los fragmentos α y β presentan un comportamiento dependiente del ión Cd(II).

Los estudios *in vitro* sobre la capacidad coordinante de MT4 frente a Cd(II) corrobora esta baja afinidad por este metal divalente. Se observó que al valorar las especies Zn-MT4 y sus dominios con Cd(II) se necesita un exceso de este metal para obtener especies únicas en solución. Las dificultades de MT4 y β MT4 para dar complejos homometálicos de Cd también se hace patente *in vitro*, ya que se detectan pequeñas cantidades de especies heterometálicas como Zn₁Cd₆-MT4 y Zn₁Cd₂- β MT4. Esto ha llevado a plantear un posible papel estructural del Zn(II) en MT4 y en el dominio β . La

necesidad de la presencia de iones Zn(II) para que la proteína pueda replegarse en solución, ya había sido descrito con anterioridad para MT1.^{122,197}

Por último, MT4 se ha sintetizado diversas veces en medios ricos en Cu(I), dando lugar a dos tipos de producciones 1 y 2. La síntesis de tipo 1 da lugar a una variedad de especies homometálicas Cu-MT donde Cu₁₀-MT4 es la especie mayoritaria, la cual se corresponde con la relación metal/MT medida por ICP-AES. Contrariamente, la síntesis tipo 2 da lugar a una mezcla de especies heterometálicas Zn,Cu-MT, donde de acuerdo con los datos de ICP, la especie Zn₃Cu₇-MT4 es la mayoritaria. A pesar de estas diferencias, ambas síntesis se encuentran relacionadas, ya que se puede pasar de las especies obtenidas en la síntesis de tipo 2 a las de tipo 1 añadiendo únicamente 2 equivalentes de Cu(I).

En la producción de tipo 2, la proteína MT4 muestra una capacidad coordinante comparable a la de MT1 (Zn₃Cu₇-MT1) y una estructuración próxima, mientras que en la de tipo 1 MT4 tiene un comportamiento frente a Cu(I) que se aleja bastante de MT1. Además es posible reproducir *in vitro* estos dos comportamientos de MT al valorar Zn₇-MT4 con Cu(I).

Contrariamente a lo que hace la proteína entera, la síntesis de los dos fragmentos dan lugar a una mezcla de especies homometálicas Cu-MT, siendo Cu₅- α MT4 y Cu₇- β MT4 las especies mayoritarias. Así, β MT4 presenta una capacidad coordinante frente Cu(I) muy próxima a β MT1 (especie mayoritaria Cu₇- β MT1),¹¹⁸ mientras que el comportamiento de α MT4 (Cu-tioneína) frente a Cu(I) es bastante diferente a la de α MT1 (Zn-tioneína),¹²² la cual se expresa como una mezcla de especies heterometálicas Zn,Cu- α MT1. Por tanto, parece que la diferencia de comportamientos entre MT4 y MT1 frente Cu(I) radica en los fragmentos α MT. Al contrario, la resistencia de MT4 respecto de MT1 a enlazar Cd(II) se ha de atribuir a las dificultades de β MT4 respecto de β MT1, para formar complejos Cd-MT.

Este conjunto de resultados ha llevado a clasificar a MT4 y sus dominios como Cu-tioneínas, que muestra una clara preferencia para enlazar metales monovalentes (Cu).¹⁹⁴

Estudios *in silico*, llevados a término mediante el program ClustalW (versión 1.75), corroboran estos resultados, de manera que el análisis comparativo de secuencias de diferentes organismos muestran que MT4 se encontraría dentro del grupo de las Cu-tioneínas mientras que MT1 se encontraría más próxima al grupo de las Zn-tioneínas.

Esta diferente capacidad coordinante de MT4 respecto a MT1 y el hecho que MT4 es sintetizada únicamente en el tejido estratificado es camoso ha llevado a concluir que

probablemente MT4 desarrolla funciones diferentes a las de MT1 y éstas pueden estar relacionadas con el rol fisiológico concreto del Cu dentro de este tipo celular.

2.3.3. Posibles funciones de MT4

A partir de los estudios sobre la capacidad coordinante de MT4, en combinación con el análisis *in silico* de secuencias de proteínas, se ha sugerido que una de sus principales funciones está relacionada con la unión de cobre.¹⁹⁶ Sin embargo, a partir de estudios biológicos también se ha sugerido que MT4 presenta un papel especial en la regulación de procesos dependientes del ión zinc en los queratinocitos.¹⁸ Por lo tanto, la metalotioneína MT4 puede estar implicada tanto en el metabolismo de cobre como en el de zinc.

3. Metalotioneínas de levadura

Levadura es el nombre común empleado para denominar ciertos hongos unicelulares eucariotas. Una de las levaduras más estudiadas es la *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 10), que tiene la facultad de crecer de forma anaeróbica, realizando la fermentación alcohólica de los azúcares o hidratos de carbono.¹⁹⁸ Ésta es uno de los organismos modelo de eucariota más intensamente estudiados en biología molecular y celular debido a su simpleza y fácil manipulación.

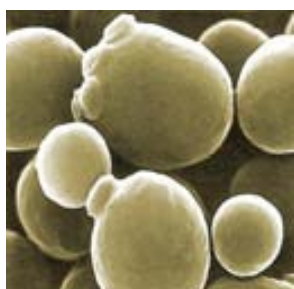


Figura 10. Imagen de un cultivo de células de la levadura *S. cerevisiae* obtenida por SEM (microscopía electrónica de barrido)

La primera MT de hongos que se identificó fue la *Cu-MT* de la levadura *S. cerevisiae*, donde el factor de transcripción Ace1 activa los dos genes que codifican para dos isoformas de MTs diferentes, denominadas Cup1^{199,200} y Crs5^{201,202} (Fig. 11).²⁰³ Los genes que codifican las dos MTs de levadura se encuentran regulados transcripcionalmente por Cu, en consecuencia, se postuló que la sobreexpresión de estas MTs conferiría resistencia a la toxicidad del cobre.^{203,204} De hecho, Cup1 se considera como una clara Cu-tioneína, por lo que también contribuye a neutralizar el exceso de cobre intracelular. En cambio, se ha demostrado que Crs5 es

significativamente más cercana a una Zn-tioneína. De acuerdo con este hallazgo, Crs5 parece tener un papel en la protección de la levadura frente a la toxicidad de zinc.²⁰⁵



Figura 11. Alineamiento en base a similitudes de secuencia mediante la aplicación del Clustalw de las isoformas de MT de *Saccharomyces cerevisiae*, Cup1 y Crs5. Marcadas de color negro las cisteínas y de rojo las histidinas.

3.1. Cup1

La isoforma Cup1 de la levadura *S. cerevisiae* se caracteriza por tener 53 aa (5812.47 Da) de los cuales 12 son cisteínas que equivalen sólo a un 20%, mientras que las MTs de mamífero contienen un 30% de Cys.²⁰⁶ A diferencia de las MTs de vertebrados, la proteína de levadura contiene un residuo de His, aunque este aparentemente no participaría en la coordinación metálica.⁵¹ Además, la composición de aminoácidos de la MT de levadura se diferencia de sus homólogos de vertebrados en un mayor contenido de ácido glutámico y asparagina.²⁰⁷ Esta proteína está codificada por el gen *Cup1*, que es regulado por Cu(I) y Ag(I), pero cuya síntesis no es inducida por iones metálicos tales como Cd(II) o Zn(II). Debido a la regulación del gen *Cup1* por Cu(I), esta proteína ha sido relacionada con la homeostasis de Cu(I). Cabe destacar que Cup1, descubierta en el año 1975,²⁰⁸ se considera la Cu-tioneína de referencia y de hecho ha sido la primera y única MT de cobre de la cual se ha resuelto la estructura (por RMN²⁰⁹ y por difracción de rayos X⁵¹) (Fig. 12). Esto permitió conocer que *in vivo* enlaza en un solo dominio entre 7 y 8 iones Cu(I) con diferentes entornos de coordinación (6 Cu trigonales y 2 digonales)²⁰⁹ mediante 10 de sus 12 Cys. A pesar de



su clara preferencia por Cu(I), estudios *in vitro* han demostrado que también puede enlazar iones divalentes como Cd(II) y Zn(II) para dar agregados M₄-Cup1.²⁰⁶ Así también *in vitro*, Cup1 enlaza el catión Ag(I) con la misma estequiometría de hasta 8 iones por molécula.²⁰⁶

Figura 12. Superposición de las estructuras de MT de la levadura *S. cerevisiae*, obtenidas por: rayos X, la Cu₈-MT (CP verde) y por RMN, la Cu₇-MT (CP roja). Los iones Cu(I) de cada estructura están representados en el mismo color que la respectiva cadena polipeptídica. También se muestran las cadenas laterales de cisteína (amarillas).⁵¹

4. Plomo(II)

4.1. Propiedades generales

El plomo tiene un peso atómico de 207.2 Da y un número atómico de 82 (grupo 14), y se encuentra ampliamente distribuido en la Tierra en sus isótopos: ^{204}Pb , ^{206}Pb , ^{207}Pb y ^{208}Pb .²¹⁰ Sus estados de oxidación más frecuentes son: 0, +2 y +4.²¹¹ El Pb^0 es fácilmente oxidable por el O_2 para dar Pb^{2+} soluble.²¹² Por otra parte, los compuestos de Pb^{4+} son agentes oxidantes fuertes y se reducen a Pb^{2+} en el medio ambiente.²¹³ Es por esto que el catión Pb(II) es la forma predominante de plomo en la naturaleza y a la que se exponen los seres vivos. Dentro de las propiedades más relevantes del ión Pb(II) se encuentra la baja solubilidad de sus sales inorgánicas: PbCl_2 es sólo moderadamente soluble, mientras que el nitrato, acetato, perclorato y citrato correspondiente son razonablemente solubles.²¹¹ Como el ión Pb(II) se hidroliza parcialmente en agua, estas solubilidades son además fuertemente dependientes del pH. Así, uno de los principales inconvenientes de la manipulación de soluciones acuosas de Pb(II) es la formación de precipitados en un amplio rango de pH ($\text{pH} \geq 5$).²¹⁴ En soluciones acuosas de $\text{Pb(ClO}_4)_2$, se forma $[\text{PbOH}]^+$ en el primer equilibrio de hidrólisis, pero la principal especie presente es $[\text{Pb}_4(\text{OH})_4]^{4+}$.

4.2. Coordinación y geometría

Los compuestos de Pb(II) existen tanto como complejos discretos como polinucleares, y en éstos el centro metálico puede presentar una amplia gama de números de coordinación, desde 2 hasta 12.²¹⁵ La estereoquímica de los complejos de Pb(II) es amplia y comprende diversas geometrías de coordinación: angular, tetraédrica, pirámide de base cuadrada, piramidal trigonal, bipirámide trigonal, octaédrica, bipirámide pentagonal, etc. El Pb(II) es considerado un ácido intermedio, dentro de la clasificación de Pearson de ácidos-bases duros y blandos,²¹⁶ y puede enlazar un amplio rango de átomos dadores, como O, N, S, P, Cl, Br o I (Fig. 13).²¹⁷ A pesar de que muchos químicos inorgánicos piensan que la “química del plomo” viene dominada por su afinidad por los tioles, de momento es mucho más habitual encontrarlo enlazado a oxígeno y/o nitrógeno, los cuales están respectivamente presentes en un 61% y 58% en la esfera de coordinación del ión Pb(II) si se consideran todos sus compuestos cristalinos depositados en el CSD.²¹⁸ Por contraste, sólo un 17% de éstos contienen uno o más azufres como átomos dadores.²¹⁸

Tal como se observa en la Fig. 14, los números de coordinación más comunes son 4 (25%), 6 (20%), 5 (12%) y 2(11%) y los números de coordinación altos son poco frecuentes (7% con $n > 8$). Es interesante destacar que los compuestos de Pb(II) tetra- o

hexacoordinados generalmente no presentan geometrías de coordinación tetraédricas u octaédricas regulares.

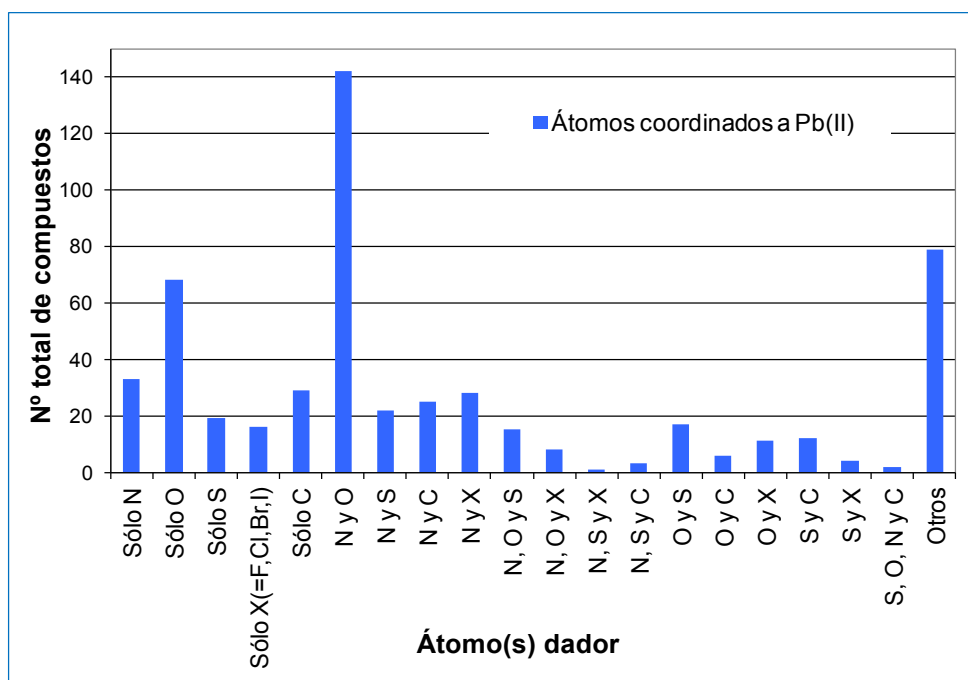


Figura. 13. Gráfica del número total de compuestos de Pb(II) coordinados a O, N, S, C y halógenos (Br, I, Cl, F) y a la combinación de éstos. "Otros" se refiere a compuestos con átomos como P, B y/o con otros metales además de Pb(II) en su esfera de coordinación (algunos como Cu, Si, W, Mo, Sn, Fe, etc).²¹⁸ (ver Tabla 61 en el Anexo 1)

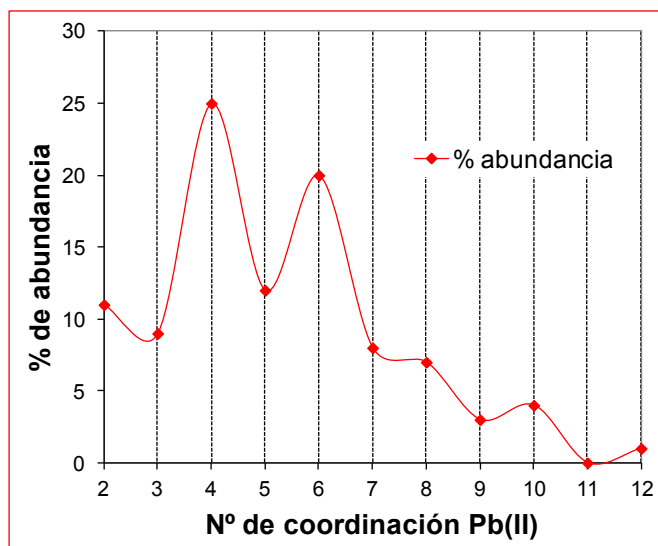


Figura. 14. Histograma de la abundancia del número de coordinación del Pb(II) en sus compuestos. Datos recogidos en el CSD.²¹⁸ (ver Tabla 61 en el Anexo 1)

Como ya se ha comentado, la presencia de azufre en la esfera de coordinación del ión Pb(II) es muy inusual. Así, sólo un compuesto con número de coordinación mayor a ocho tiene sólo azufre en su esfera de coordinación, PbS₁₀, y un 63% de las estructuras descritas que contienen azufre tienen un número de coordinación menor a seis. Cabe destacar que para los complejos de Pb(II), el "número de coordinación" puede ser algo poco preciso, ya que este ión puede dar lugar a interacciones secundarias.

4.3. Efecto del par inerte

El catión Pb(II) tiene una configuración electrónica $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2$, con 2 electrones de valencia y 3 orbitales 6p vacíos, y exhibe el llamado “efecto del par inerte”.²¹⁹ Esto significa que este par de electrones puede participar o no en la formación de enlaces, determinando así la geometría de coordinación de los compuestos de Pb(II). Este factor contribuye en la determinación de la disposición de los ligandos alrededor del ión Pb(II) generando dos tipos de geometrías (Fig. 15).²¹⁵

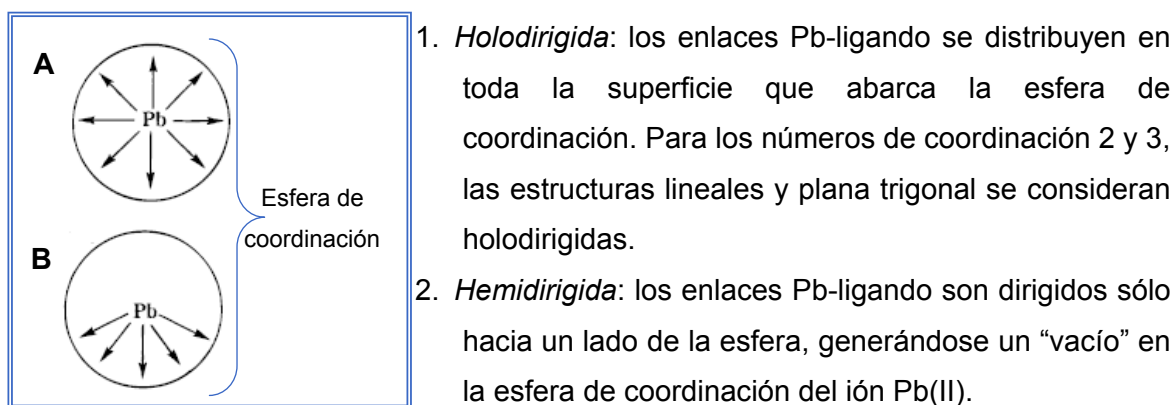


Figura. 15. Tipos de geometrías de los complejos de Pb(II): (A) holodirigida y (B) hemidirigida

Para números de coordinación bajos (2-5), los compuestos de Pb(II) muestran estructuras hemidirigidas con todos los ligandos agrupados en un lado del metal dejando la otra cara ocupada por el par inerte estereoquímicamente activo,^{213,215} y tienden a contener ligandos duros (O, N) con interacciones entre ellos (quelantes, bidentados, sistemas de anillos). Por el contrario, para números de coordinación altos (9-10) las geometrías de coordinación son holodirigidas (par inerte estereoquímicamente inactivo) y sus ligandos tienden a contener átomos dadores relativamente blandos y voluminosos, o muestran una fuerte repulsión entre ligandos (S, Cl, Br, I). Para números de coordinación intermedios (6-8) se encuentra cualquiera de los dos tipos de estereoquímica siendo la geometría holodirigida más abundante que la hemidirigida, aunque esto depende del tamaño del ligando y la naturaleza del grupo dador.²¹³

En solución, el catión Pb(II) parece optar por números de coordinación bajos (3) y geometría de pirámide trigonal, mientras que en estado sólido tiene preferencia por números de coordinación más altos (5-8).²¹⁴

4.4. Tiolatos de Pb(II)

Los tiolatos, como ligandos (aniones RS^-),^{220,221} tienen una gran afinidad por un elevado número de metales, particularmente por aquellos con elevada densidad

electrónica, debido a su carácter de ligando blando. Se caracterizan por ser fácilmente oxidables, tener un carácter básico y también por un comportamiento como ligandos π -dadores con elevada tendencia a actuar como ligandos puentes (si bien también actúan fácilmente como ligandos terminales).

Los tiolatos de Pb(II) muestran generalmente números de coordinación entre 2 y 8, siendo los más abundantes los tetracoordinados,²¹⁸ sin embargo la coordinación a cuatro tiolatos muy raramente genera una disposición perfectamente tetraédrica.²¹⁴ Si bien se pueden encontrar algunos compuestos de Pb(II) con tioles como únicos ligandos, la mayoría de los tiolatos de Pb(II) también contienen uno o más ligandos O-, N-, C- y/o Cl-dadores, observándose que gran parte de éstos presentan 1, 2 o 3 tiolatos en su esfera de coordinación.²¹⁸

-Piramidal $M(SR)_3$: $[Pb(SC_6F_5)_3]^- (Ph_4P^+)$,²²² $[Pb(SPh)_3]^- (Ph_4As^+)$ ²²³

-Tetraédrica $M(SR)_4$: Ar_3PbSR ²²⁴

-Piramidal trigonal $M(SR)_3$: Tris(2-mercapto-1-fenilimidazolil)hidroborato, $[[TmPh]Pb][ClO_4]$ (Fig. 16).²²⁵

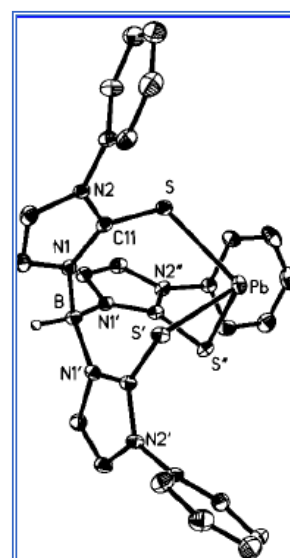


Figura 16. Estructura molecular del catión $[[TmPh]Pb]^+$.²²⁵ Esta estructura muestra que el ión Pb(II) prefiere coordinarse por medio de tres ligandos en forma piramidal trigonal dejando su par de electrones libre.

Algunos estudios de complejos de plomo(II) con ligandos orgánicos que contienen átomos de azufre dadores han determinado que la estructura del ión Pb(II) implica la participación activa del par de electrón solitario $6s^2$.^{213-226,227} Así también, estudios de química cuántica sobre compuestos de Pb(II) con n ligandos S- y N-dadores,^{228, 229} corroboran la participación del par de electrones en la geometría de coordinación del ión Pb(II) por efecto del número de ligandos y su composición, y concluyen que este par "inerte" es estereoquímicamente activo y se manifiesta en una distorsión del entorno de coordinación del átomo de Pb(II) con 2, 3 y 4 ligandos S- o N-dadores, tal como se puede ver en la Fig. 17. Sin embargo, la información sobre estudios de compuestos de Pb(II) con ligandos orgánicos S-dadores sigue siendo escasa.^{228,230,231,232}

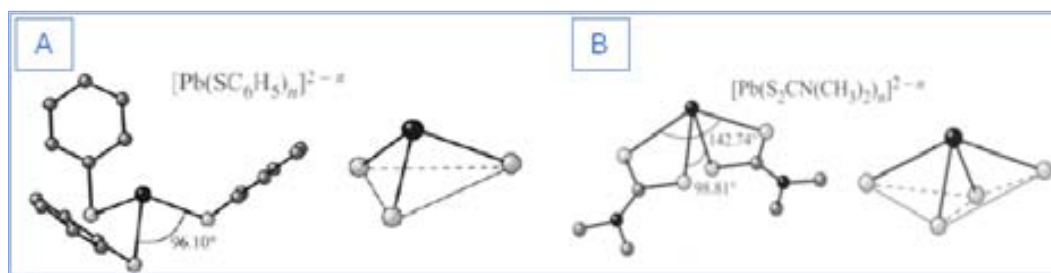


Figura 17. Ejemplos de dos geometrías de coordinación de compuestos de Pb(II) con ligandos azufre (C_2). Según los antecedentes serían las posibles preferencias por este ión, (A) piramidal trigonal ($n=3$) y (B) Silla de montar ($n=4$).²²⁹

En uno de los estudios de química cuántica basado sobre modelos de complejos de Pb(II) que imitan la posible estructura y coordinación que se da en las proteínas denominadas “dedos de zinc”, y junto con los datos bibliográficos, se determinó, por medio de cálculos de energía, que el complejo tricoordinado más estable es $[PbS_3]$ y el menos estable es el $[PbN_3]^{2+}$, tal como se puede observar en la Fig. 18, y donde se muestra que para el complejo Pb-S₃ es energéticamente más favorable aceptar un cuarto ligando de S-tiolato sobre un N-imidazol (Fig. 18).²²⁸ La alta afinidad de Pb(II) a tiolatos de cisteína es presumiblemente debido a la alta entalpía de la formación del enlace Pb-S.²³⁵

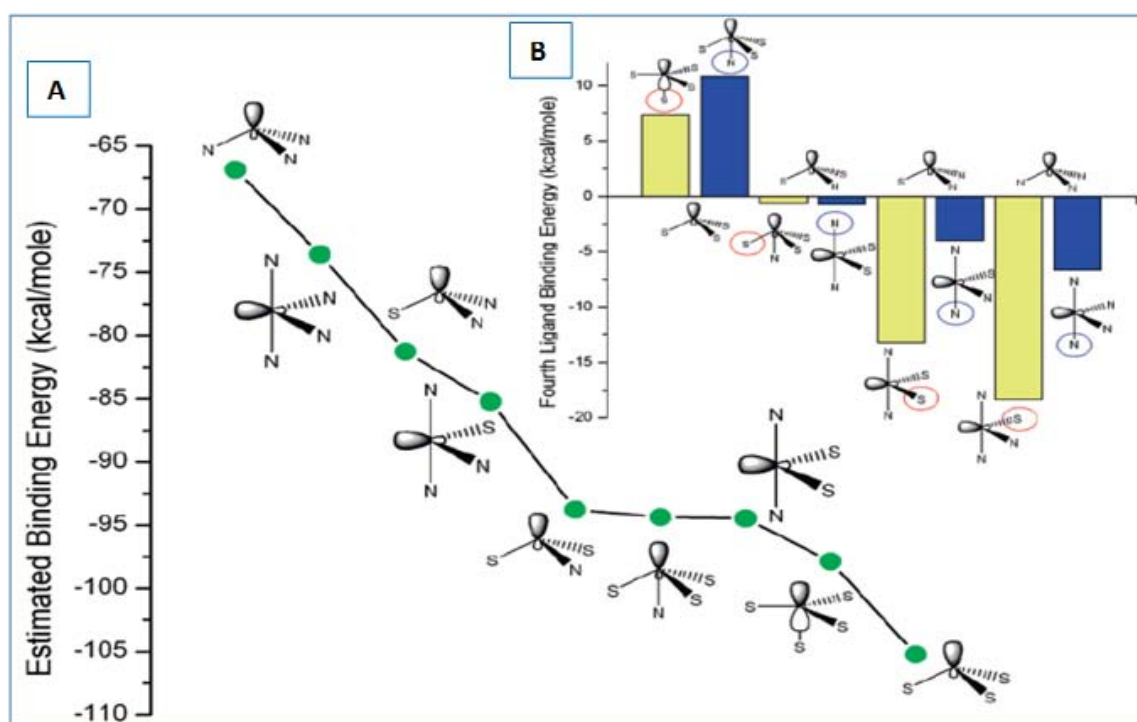


Figura 18. (A) Gráfica de la estimación de las energías de enlace de los complejos de plomo, computo acorde de la fórmula $E_e = E_c - E_i - \sum_i E_i$ (B) Gráfica de la estimación de las energías de formación de complejos tetracoordinados a partir de los correspondientes complejos tricoordinados, computo acorde a la fórmula $E_f = E_e, \text{tetra} - E_e, \text{tri}$.²²⁸

Por otra parte, dado que durante mucho tiempo se ha considerado que el ión Pb(II) era espectroscópicamente silencioso, en la bibliografía sólo se encuentran algunos

estudios con datos espectroscópicos de los tiolatos de Pb(II) en los cuales se relacionen las absorciones con los diferentes entornos de coordinación que puede presentar el catión Pb(II). Aún así, es bien sabido que el enlace Pb-SCys en proteínas da lugar a la aparición de bandas de absorción intensas en la región del UV-vis.²³³ Como el plomo no exhibe transiciones d-d, estas absorciones han sido atribuidas a transiciones intraatómicas y de transferencia de carga (TC).

4.5. Espectroscopía de RMN de ²⁰⁷Pb

Una de las últimas técnicas utilizadas para estudiar las estructuras de los sitios activos de Pb(II) en las metaloenzimas y compuestos modelos (Pb-S) es la espectroscopía de resonancia magnética nuclear RMN. El plomo posee un núcleo activo en RMN (isótopo ²⁰⁷Pb, I=1/2) con una abundancia natural de 22,6% y una excelente receptividad (11,7 veces mayor que la de ¹³C).²³⁴

Sin embargo, debido a la amplia gama de desplazamiento químico (más de 16000 ppm), el uso de RMN ²⁰⁷Pb no es trivial.^{234,235,236,237} Según la literatura, el primer ejemplo del uso de la espectroscopía de RMN de ²⁰⁷Pb (usando ²⁰⁷Pb isotópicamente enriquecido) como una sonda en metaloproteínas fue para estudiar la unión de Pb(II) al sitio de unión a Ca(II) en proteínas de calcio, como la calmodulina.²³⁸ También se han caracterizado mediante esta técnica una serie de pequeñas moléculas sintéticas con ligandos dadores con o sin mezcla de O, S y N (por ejemplo S₂O₂, S₂N₂, N₂O₄, N₃O₃, N₄, N₆).^{234,236,237,239,240,241} La señal de RMN para ²⁰⁷Pb en sitios de unión ricos en tioles está desplazada a campos más bajos que los sitios de unión de calcio, ricos en oxígeno y nitrógeno. Así, mediante RMN de ²⁰⁷Pb se puede distinguir muy fácilmente los entornos de coordinación de PbS₃ frente a PbS₃O.²³⁴ El número de coordinación y geometría del ión Pb(II) también ha sido examinado.²¹³

A pesar de estos estudios, no hubo un avance significativo para lograr explorar las proteínas estructurales (*scaffolds proteins*) ricas en tiolatos mediante RMN de ²⁰⁷Pb. Sin embargo, en el año 2010 Neupane y Pecoraro²⁴² estudiaron con esta técnica, una serie de metalopéptidos ricos en tiolatos que permiten la coordinación del ión Pb(II) con una geometría piramidal trigonal de preferencia homoléptica mediante la utilización de péptidos de tres hebras plegadas en espiral (*coiled-coil*), dando lugar a motivos Pb-Cys₃ parecidos a los observados en las metaloenzimas ricas en tioles, tales como ALAD, que están directamente implicados en el envenenamiento por plomo en humanos. Un año más tarde, este mismo grupo reportó un estudio sobre la unión de plomo a glutatión y a los dedos de zinc,²⁴³ demostrando así que la espectroscopía de RMN de ²⁰⁷Pb podría ser provechosamente aplicada a la comprensión del mecanismo molecular de la toxicidad del Pb(II) en sistemas ricos en tiolatos.²⁴²

5. Química biológica del Pb(II)

5.1. Toxicidad del Pb(II)

El plomo en su estado natural es frecuente en la naturaleza, es un contaminante ambiental ubicuo y potencialmente cancerígeno que se encuentra en una amplia variedad de ambientes geoquímicos.²⁴⁴ Actualmente su presencia en el medio ambiente es notoria por la utilización industrial de plomo, que ha llevado a tener unos 300 millones de toneladas de este metal dispersas en todo el mundo provenientes de fuentes antropogénicas, tanto industriales (plantas, suelos contaminados) como domésticas (tuberías de agua),²¹³ que pueden provocar toxicidad en los seres vivos por varios mecanismos posibles.

Los efectos tóxicos producidos por plomo en mamíferos pueden manifestarse en diversos órganos, pero el cerebro y el riñón son claramente los objetivos principales.^{245,246,247,248,249}

Existen pruebas convincentes de que la exposición a Pb en niños y adultos (niveles de plomo en sangre igual o superior a 10 y 40 -120 $\mu\text{g dL}^{-1}$ en niños y adultos, respectivamente)²⁵⁰ pueden causar problemas neurológicos.^{248,249,251} Un ejemplo claro se da en personas que trabajan expuestas a plomo, que aumentan su factor de riesgo para padecer la enfermedad de Parkinson (EP).²⁴⁵ Además un estudio muestra que la proteína α -sinucleína (relacionada con la EP) y la metalotioneína, cuando son expuestas a Pb(II), parecen favorecer la formación de cuerpos de inclusión (CIs) como respuesta a la toxicidad de este metal.²⁵² De manera similar, una patología como la enfermedad de Alzheimer, también degenerativa y que afecta al cerebro, ha sido recientemente inducida en monos adultos después de la exposición a Pb al inicio de su vida.²⁴⁹ Un concepto importante en la evolución de la neurotoxicidad por plomo es que los factores ambientales pueden desempeñar un papel en la creciente susceptibilidad.²⁴⁸

Una característica común frente a la intoxicación por plomo es la producción de complejos Pb-proteína que aparecen en las células diana, de seres humanos o de animales intoxicados, como cuerpos de inclusión. Después de niveles tóxicos de exposición a plomo, primero se forman los CIs en el citoplasma y luego migran al núcleo.²⁵³ Estos CIs son comunes en el riñón, pero también se pueden encontrar en las células del sistema nervioso y otros sitios diana de Pb.^{254,255} Las responsables de la acumulación de plomo como CIs son las proteínas de unión a plomo (PbBPs), cuya historia se remonta a 1936, cuando Blackman describió por primera vez la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares en el hígado y el riñón como manifestaciones de la intoxicación por plomo.²⁵⁶ El origen y la naturaleza de estas proteínas, componentes de

los cu erpos de in clusión, siguen siendo poc o cl aros, pero és tas son cl aramente protectores contra la toxicidad aguda y crónica de plomo,^{257,258} ya que unen grandes cantidades de Pb y probablemente lo hacen toxicológicamente inerte, bloqueando de este modo las interacciones con los objetivos celulares más críticos.²⁵⁹

Las PbBPs se producen en muchos órganos del cuerpo, que incluyen los riñones (timosina β_4 y ac il-CoA),²⁶⁰ el cerebro (contiene dos proteínas que enlazan endógenamente Pb, la timosina β_4 ²⁶¹ y también existe otra proteína no identificada de 23 kDa), eritrocitos (ALAD),^{262,263} hígado,^{264,265} pulmón²⁶⁶ e intestinos²⁶⁷ (proteínas de unión a Ca), proporcionando una cierta protección contra la toxicidad de plomo al secuestrar a este ión en una forma no tóxica.^{259,268} La mayoría de éstas proteínas se caracterizan por tener un bajo peso molecular, inducibles por la exposición a plomo y/o constitutivas (es decir, presentes en el organismo en todo momento). Un ejemplo es la enzima δ -aminolevulínico deshidratasa (ALAD), que está presente en alta concentración en los eritrocitos, y aunque es altamente inducida por la exposición a plomo, a la vez es especialmente sensible a la inhibición por este metal.

Debido a la gran toxicidad de los metales pesados, como el Pb(II), los organismos han desarrollado diversos mecanismos de defensa y detoxificación, en donde pequeñas moléculas ricas en Cys, como las metalotioneínas y el glutatión (fitoquelatinas en plantas),²⁶⁹ secuestran los iones tóxicos limitando así la forma libre y toxicológicamente activa,²⁷⁰ antes que éstos puedan causar efectos dañinos. El catión Pb(II) se une a las MT *in vivo*²⁷¹ y los niveles tisulares de MT aumentan después de la exposición a plomo.²⁶⁵ Las isoformas predominantes en mamíferos, MT1 y MT2, son inducidas después de la exposición a diversos metales.²⁷²

El ión Pb(II) es una toxina químicamente interesante que puede reemplazar iones metálicos fisiológicamente esenciales, tales como Ca(II) y Zn(II), en los sitios activos "duros" de las proteínas, ricos en oxígeno y nitrógeno. También puede atacar a los ligandos más blandos, especialmente aquellos que contienen azufre. Así, este catión tóxico interactúa con varias enzimas o proteínas de zinc^{273,274} (tales como ALAD,²⁶³ anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, proteínas "dedos de zinc"²³³ Cys₄, Cys₃His, Cys₂His₂²⁷⁵ y ácidos fosfatasa) y proteínas de unión de iones Ca(II)²⁷⁶ (calmodulina,^{277,278} calbindina, y troponina C, sinaptotagmina I,²⁷⁹ proteína quinasa C²⁸⁰) (Fig. 19)

La toxicidad asociada con el envenenamiento infantil por plomo ha sido atribuida a interacciones de Pb(II) con proteínas que contienen sitios estructurales de unión a zinc ricos en tioles, participando en la inhibición de la síntesis de hemoglobina (ALAD), causando anemia y dañando el sistema nervioso y el cerebro. Además, el catión Pb(II)

inhibe a la enzima ferroquelatasa, interfiriendo en las etapas de la síntesis de las ferroporfirinas y afectando la incorporación de Fe(II) a la porfirina.²⁶⁹

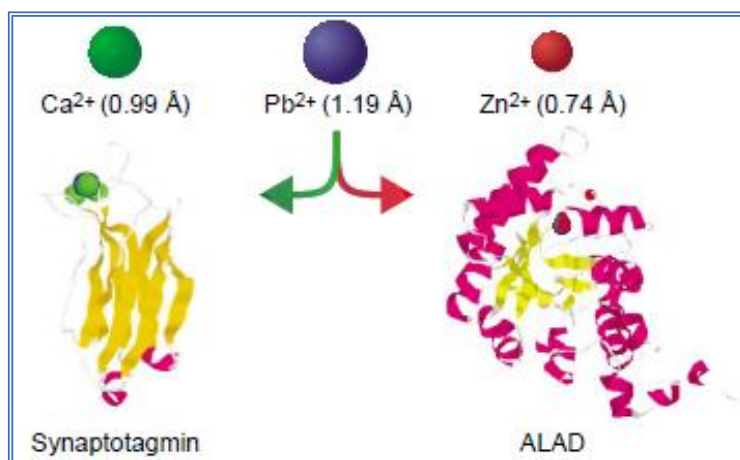


Figura 19. Ejemplos de proteínas diánas de Pb(II) que naturalmente enlazan calcio y zinc: sinaptotagmina^{281, 282} y ALAD,^{263,273} respectivamente. Cada una de estas proteínas fue cristalizada con Pb(II). Extraído de Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>).²⁸³

5.2. Coordinación de Pb(II) a proteínas de zinc

Muchas enzimas y proteínas contienen zinc y éste puede tener funciones catalíticas o estructurales.²⁸⁴ Se ha demostrado que, tanto *in vitro* como *in vivo*, el ión Pb(II) se une a las proteínas que naturalmente están enlazando Zn(II), inactivándolas.²¹³ El Pb(II), debido a su natural afinidad por los tiolatos, se dirige específicamente a los sitios ricos en tiolatos cisteínicos (Cys) de las proteínas, como son: ALAD y CadC, factores de transcripción como GATA²⁸⁵ y dedos de Zn,²³³ y receptoras de esteroides, y metalotioneínas, entre otras,^{283,286} que normalmente son sitios estructurales de unión a Zn(II). A continuación se dan a conocer antecedentes relevantes de la unión de Pb(II) a algunas proteínas de zinc:

➤ **Ácido aminolevulínico deshidratasa, ALAD**

Una de las diánas del catión Pb(II) más estudiadas es la enzima ALAD (δ -aminolevulínico deshidratasa) una proteína homo-octamérica (300 KDa aprox.) (Fig. 19), que se encuentra en mamíferos y levedura. Una de sus funciones principales es catalizar la segunda reacción de la ruta de biosíntesis de los grupos hemo. Esta proteína tiene cuatro sitios activos que enlazan a 2 iones Zn(II) funcionalmente diferentes,^{287,288} uno de estos sitios (ZnB) contiene un Zn(II) enlazado a tres residuos de Cys, con el cuarto sitio de coordinación posiblemente ocupado por una molécula de agua o un ión hidróxido,^{289,290} mostrando un sitio activo Zn(SCys)₃ inusual. Cuando la

enzima es co-cristalizada con Pb(II), éste es también encontrado predominantemente en este sitio como Pb-S₃ con una geometría piramidal trigonal.^{263,289,291}

La actividad de ALAD es inhibida en presencia de iones Pb(II) al reemplazar el Zn(II) en el sitio ZnB rico en cisteínas^{263,289} formando un sitio trigonal de Pb-S₃, que sugiere que el mecanismo de envenenamiento por plomo puede ser la formación de una estructura metálica incorrecta en el sitio ZnB,^{225, 292, 293} causando anemia en los mamíferos, que *in vitro* es inhibida por bajas concentraciones de Pb(II),²⁷³ mientras que *in vivo* puede ser revertida por el consumo de cantidades suficientes de Zn(II).²¹³

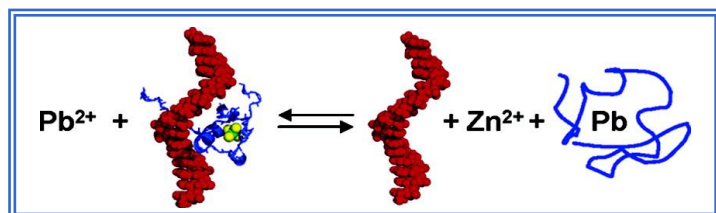
Los estudios realizados con modelos de compuestos Pb(SR)₃, como el complejo [[TmPh]Pb][ClO₄] (Tris(2-mercapto-1-fenilimidazolil)hidroborato, ver Fig. 4), han demostrado que el Pb(II) es 500 veces más afín que el Zn(II) por sitios de este tipo, explicando así por qué el ión Pb(II) es un potente inhibidor de ALAD.²²⁵

Otras dianas en la toxicidad del Pb(II) que incluyen factores de transcripción que utilizan regiones ricas en cisteínas de unión a Zn(II), o incluso el clásico motivo de dedo de zinc que tiene una composición Cys₂His₂,^{233,285,286} se detallan a continuación:

➤ GATA

Trabajos recientes sugieren que otra de las dianas de Pb(II) es la proteína GATA, una clase de factores de transcripción que contiene dominios estructurales de unión a zinc ricos en cisteína como Cys₄ (también en receptores esteroides y dedos de zinc) que normalmente enlazan Zn(II).^{233,285} Se ha demostrado que el Pb(II) puede desplazar el Zn(II) de estos sitios en condiciones fisiológicas que perturban la interacción ADN/GATA, como se puede observar en la Fig. 20. En donde el Pb(II) exhibe una geometría de coordinación diferente que el Zn(II), alterando la estructura de los dominios de unión a zinc que es la probable razón porque el Pb(II) inhibe la función de GATA. Este resultado es particularmente significativo dado que las proteínas que contienen sitios Cys₄ desempeñan roles críticos en la regulación de muchos procesos de desarrollo neurológico y en la formación de los glóbulos rojos que se ven afectados por el envenenamiento por plomo.^{283,285,294}

Figura. 20. Interacción de Pb(II) en las proteínas ADN/GATA.²⁸⁵



Los espectros de UV-vis de la coordinación del Pb(II) a las cisteínas en el sitio de unión a Zn(II) en la proteína GATA (Fig. 21), muestran la aparición de dos bandas intensas alrededor de 264 y 335 nm, las cuales surgen de la combinación de transiciones de transferencia de carga e intraatómicas de Pb(II).

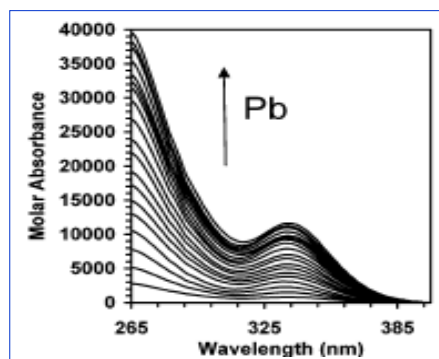


Figure 21. Espectro de UV-vis de la valoración de la proteína GATA con Pb(II) que muestra el aumento de las bandas de Pb-tiolato.²⁸⁵

➤ *Dedos de zinc*

Otra de las proteínas de zinc ricas en tioles que interaccionan con Pb(II) son los “dedos de zinc”.²⁹⁵ Éstos son esenciales para la regulación génica, la activación transcripcional y el desarrollo. Los metales pesados tales como Pb(II) pueden reemplazar los iones Zn(II) en diversos tipos de dedos de zinc (SP1 y TFIIIA) y perturban o inhiben sus funciones.^{296,297} Se ha demostrado que el ión Pb(II) (y As(III), Cd(II), Hg(II)) inhibe el proceso de reparación del ADN debido al desplazamiento del ión Zn(II) en las estructuras de dedos de zinc de las proteínas de reparación de ADN.^{298,299}

Basado en los conjuntos de ligandos presentes en los sitios de unión metálica, los dedos de zinc son clasificados en 3 tipos (7): (i) Cys₂His₂ o tipo de factor de transcripción celular (ejemplo, Xenopus TFIIIA, Sp1) (Fig. 22A); (ii) Cys₂HisCys o tipo retroviral, representado por las proteínas nucleocápsides retrovirales (HIV) (Fig. 22B) y (iii) Cys₄ o tipo de receptor de hormonas esteroide/tiroides (Fig. 22C).

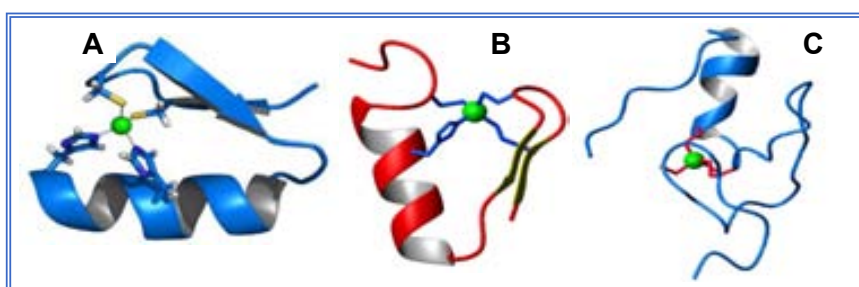


Figura. 22. Dedos de zinc:
A) Cys₂His₂,
B) Cys₃His,
C) Cys₄

El grupo de Godwin realizó estudios sobre la unión de Pb(II) en una serie de fragmentos de unión a zinc de los péptidos modelo de los dedos de zinc (CP-CCHH, CP-CCHC y CP-CCCC) y el dominio de unión a zinc de la proteína nucleocápside HIV

(HIV-CCHC) por ser potenciales objetivos para Pb(II).^{233,285} A partir de los resultados obtenidos han sugerido que el Pb(II) se une preferentemente en un entorno de coordinación PbS₃, mientras que el Zn(II) se une a cuatro ligandos de forma tetraédrica. De manera que el Pb(II) no estabiliza el correcto plegamiento de estos péptidos como lo hace el Zn(II).^{296,297}

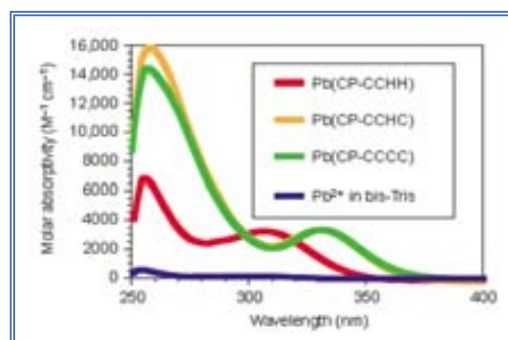
Zawia y sus colaboradores han sugerido que el Pb(II) se dirige al péptido sintético de dedo de zinc "Cys₂His₂" que se encuentra en el factor de transcripción de la proteína Sp1 y desplaza el Zn(II), alterando la estructura de los motivos de los dedos de zinc y en consecuencia la alteración de la regulación de la expresión de genes.²⁹⁶

Así, los estudios de Godwin de una serie de péptidos modelo con centros Cys₂His₂, Cys₃His y Cys₄ (Fig. 22) demuestran que el Pb(II) se enlaza con mayor afinidad que el Zn(II) en los sitios Cys₄ ($\log K_b^{Pb} = 13.6$) y Cys₃His ($\log K_b^{Pb} = 10.1$) y que el Pb(II) no puede competir con el Zn(II) para enlazarse a los sitios Cys₂His₂.²³³ Esto es probablemente debido al plegamiento incorrecto de los péptidos y que la histidina no coordina fuertemente los iones Pb(II).

Además, se determinó mediante XAS y rayos X, que el número de coordinación de Pb(II) no variaba cuando este se enlazaba a los péptidos Cys₄ y Cys₃His, demostrando así que el Pb(II) sólo se une a tres de las cuatro cisteínas disponibles en los sitios Cys₄, con geometría piramidal trigonal.

En estos estudios se pudo observar que los espectros de absorción electrónica de los complejos modelo Pb-dedo de Zn presentan dos bandas: una intensa a 255-260 nm ($\epsilon = 16000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y otra, menos intensa, entre 300-350 nm ($\epsilon = 4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Fig. 23).²³³ Estos espectros concuerdan con los obtenidos en el estudio de Klotz³⁰⁰ de espectroscopía de absorción de Pb(II) enlazado a proteínas ricas en cisteína, que muestra un espectro típico para los complejos Pb-tiolato que consiste en dos bandas de TCLM (del ligando hacia el metal): una absorción intensa a ca. 250 nm y otra próxima a 340 nm.²¹³ Esto deja de manifiesto que este espectro revela una especie PbS₃ con una geometría piramidal trigonal.

Figura. 23. Espectros de absorción UV-vis de los complejos Pb-CCHH, Pb-CCHC y Pb-CCCC (dedos de Zn).²³³



Recientemente, el grupo de Pecoraro ha realizado un estudio mediante la técnica de RMN de ²⁰⁷Pb sobre los péptidos dedos de zinc, utilizando HIV-CCHC como péptido modelo para estudiar el modo de enlace de Pb(II).²⁴³ El espectro de UV-vis de Pb(HIV-

CCHC) (a pH 7.0) presenta una banda TCLM a ~ 334 nm, que indica entornos de coordinación PbS_3 . Las bandas de absorción y coeficientes de extinción son muy similares a las observadas por Godwin.²³³ Sin embargo, el espectro de RMN de ^{207}Pb (Fig. 24) muestra dos señales de Pb(II) ($\delta = 5790$ y 5744 ppm) con diferentes intensidades. Estas señales se encuentran dentro del desplazamiento químico entre 5500-5800 ppm asignado a las especies PbS_3 con geometría piramidal trigonal en sitios de tioles homolépticos, observadas en péptidos²⁴² y pequeñas moléculas sintéticas.^{213,223,301,302}

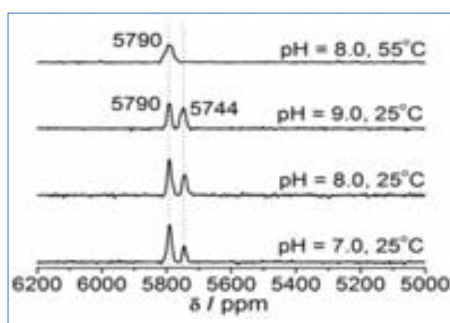


Figura 24. Espectros de RMN de ^{207}Pb de $\text{Pb}(\text{HIV-CCHC})$ en una razón 1:1 molar $\text{Pb}(\text{II})$:péptido a tres pH diferentes 9.0, 8.0 y 7.0 a 25°C , los espectros fueron registrados por 2h usando $^{207}\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ enriquecido ($^{207}\text{Pb}=92.4\%$).²⁴³

Estos resultados están en línea con los obtenidos por el grupo de Godwin²⁸⁶ de los péptidos modelos de dedos de zinc mediante EXAFS y de los correspondientes estudios computacionales realizados por Jarzęcki.²²⁸ Esto sugiere que los picos observados para $\text{Pb}(\text{HIV-CCHC})$ se deben a la formación de motivos PbS_3 en dos conformaciones diferentes y que una de ellas es más estable a altas temperaturas.

Por otra parte, se demostró que el $\text{Pb}(\text{II})$ no se une al péptido de HIV-CCHH, corroborando la preferencia por el entorno de coordinación PbS_3 , debido a que este péptido no se pliega correctamente de modo que la His no es accesible para la coordinación, lo que puede explicar en parte por qué el $\text{Pb}(\text{II})$ precipita con el péptido HIV-CCHH.

➤ **PbrR691**

Una nueva diana de $\text{Pb}(\text{II})$ es la proteína reguladora PbrR691 ^{303,304} que pertenece a la familia MerR de factores de transcripción, encontrada en *Ralstonia* (o *Cupriavidus*) *metallidurans* CH34, una bacteria específicamente adaptada para sobrevivir en un ambiente tóxico de metales pesados. PbrR691 regula las concentraciones de una gama de metales tóxicos o iones esenciales en las bacterias.^{305,306} Ésta enlaza plomo(II) casi 1000 veces más selectivamente que otros iones metálicos, tales como $\text{Hg}(\text{II})$, $\text{Cd}(\text{II})$, $\text{Zn}(\text{II})$, $\text{Co}(\text{II})$, $\text{Ni}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{I})$ y $\text{Ag}(\text{I})$.^{303,307,308} Esta proteína, junto con sus homólogos en la misma bacteria, son las únicas proteínas de unión específica a $\text{Pb}(\text{II})$ conocidas que se encuentran en la naturaleza.³⁰⁹

Los estudios espectroscópicos de UV-vis de la proteína PbrR691 unida a Pb(II) (Fig. 25) muestran una banda de transferencia de carga a 337 nm ($\epsilon=3625 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$),³⁰³ semejante a la absorción de los péptidos con Pb(II) modelos de PbS_3 en una geometría hemidirigida,²⁸⁶ que reveló un complejo Pb-tiolato con la participación de tres residuos de Cys como ligandos a Pb(II).^{233,310}

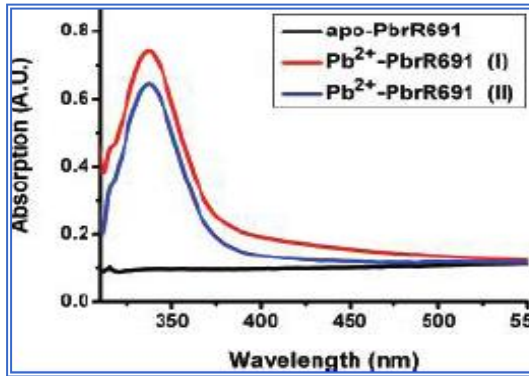


Figura 25. Espectros de UV-vis de dos muestras del complejo Pb(II)-PbrR691. (muestra I, dímero [0.18 mM], $\epsilon=3589 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 337 nm; muestra II, dímero [0.15 mM] $\epsilon=3600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).³⁰³

Mediante rayos X y EXAFS se confirmó esta observación, que muestra un complejo PbS_3 que contiene un centro de Pb(II) hemidirigido unido por tres ligandos de S a una distancia de 2.71 Å, similar a las otras proteínas de unión a Pb(II),²⁸⁶ tal como se puede ver en la Fig. 26.^{303,304}

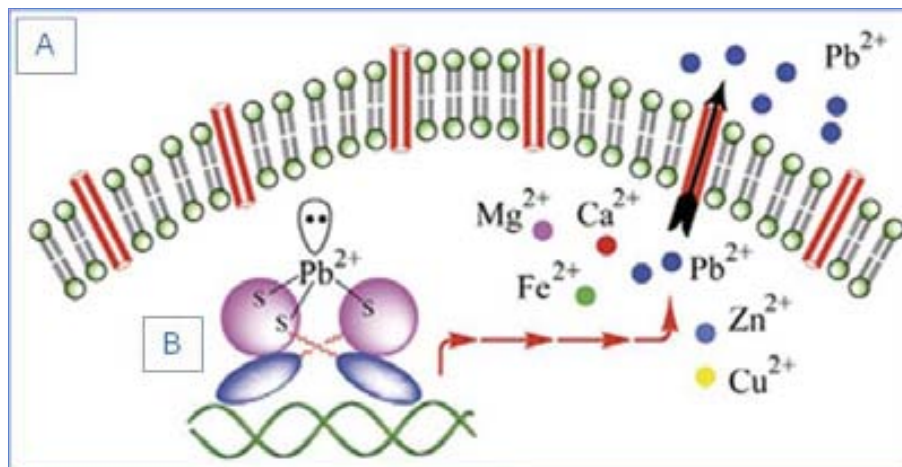


Figura 26. (A) Propuesta de un mecanismo para el reconocimiento selectivo de Pb(II) por la proteína PbrR691 en la bacteria *R. metallidurans*; (B) preferencia de Pb-S_3 por una geometría hemidirigida.³⁰⁴

➤ **CadC**

Una de las tantas dianas de Pb(II) es la proteína CadC, miembro de la familia de proteínas metaloregadoras ArsR/SmtB que son reguladores negativos de los codones responsables de la detoxificación de los iones metálicos tóxicos (como Cd(II), Zn(II), Pb(II) y Bi(II)).^{311,312} La proteína CadC (Fig. 27) es un homodímero débilmente asociado con una subunidad de peso de 27.6 kDa y dos sitios de unión de metal ricos en tiolatos:

sitio α_3N , el cual generalmente coordina iones metálicos pesados como Cd(II), Bi(III) y Pb(II), y un segundo sitio en el C-terminal, llamado α_5 , el cual enlaza iones metálicos duros como Co(II) y Zn(II). Se sabe que la región de unión de metales pesados α_3N requiere átomos de azufre de tioatos de los residuos cisteínicos³¹³ (Cys7 y/o Cys11 del brazo de N-terminal y Cys52, Cys58 y Cys60 de la hélice α_3 en espiral I) de ambas subunidades.³¹⁴

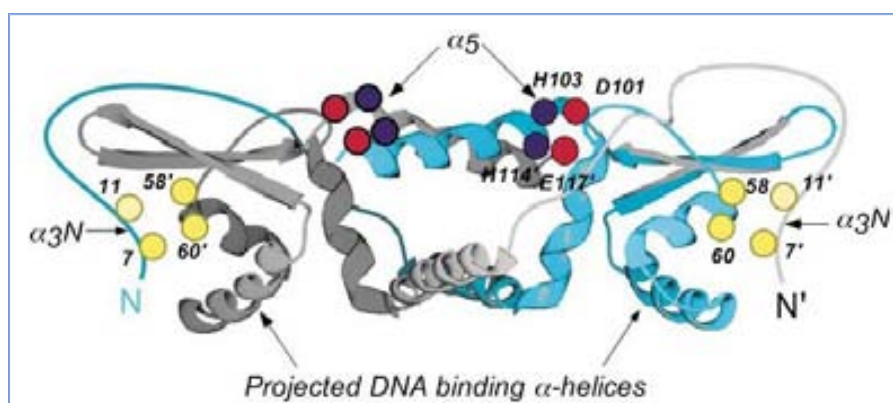


Figura 27. Predicción de estructura terciaria de *S. aureus* pl258 CADC generado por Model-Swiss en <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/44> utilizando la estructura cristalográfica de rayos X de *Synechococcus* SmtB13 como la estructura base. En los sitios de unión a metales α_3N y α_5 se muestran con esferas de color rojo los átomos de nitrógeno, esferas azules como átomos de oxígeno y esferas amarillas como átomos de azufre (cisteínicos).³¹⁵

Mediante los resultados espectroscópicos se ha sugerido que el ión Pb(II) prefiere coordinarse por medio de tres Cys (Cys7, Cys58 y Cys60) para dar lugar a sitios $Pb(SCys)_3$ ³¹⁵ en la CadC, posiblemente formando una estructura piramidal trigonal, así como también en su forma apo-CadC,^{315, 316} corroborando una vez más, que la presencia de ligandos tioato adicionales no llevan a un aumento del número de coordinación de Pb(II). Esto se refleja en los estudios por UV-vis de CadC (Fig. 28) que muestran una absorción de TC a 240 nm ($44.000 M^{-1}cm^{-1}$), y un hombro intenso a 346 nm ($4.000 M^{-1}cm^{-1}$).³¹⁵ También se pudo observar que dependiendo de las Cys que participan en la coordinación del ión Pb(II) las absorciones varían entre 325 (C7G,C60G), 337 (C58S) y 350 nm (C11G).

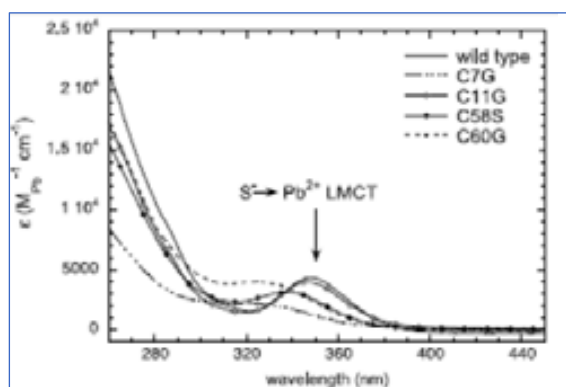


Figura 28. Espectros de UV-vis de proteínas de CadC con Pb(II). Condiciones: 10 mM Bis-Tris, 0.20 M NaCl, pH 7.0, 25 °C.³¹⁵

Además, los estudios de EXAFS de CadC revelaron distancias de Pb-S de 2.63 Å, que indican una preferencia de Pb(II) por un entorno de coordinación PbS_3 ,³¹⁵ que se compara bien con las distancias de Pb-S encontradas para el plomo que inhibe el sitio activo de ALAD y en otras proteínas como los dedos de zinc.

➤ **Protamina 2 humana (HP2)**

Otra de las dianas de Pb(II) es la Protamina 2 humana (HP2), que desempeña un papel importante en la espermatogénesis.³¹⁷ La HP2 es una proteína pequeña de carácter básico, rica en argininas, que proporcionan cargas positivas requeridas para la neutralización de los fosfatos del ADN y también contienen residuos cisteína, que forman puentes disulfuros intermoleculares, aumentando la estabilidad del complejo de ADN-proteína.^{318,319} Los resultados del estudio *in vitro* muestran que el Pb(II) puede interactuar con la proteína de zinc HP2 (con una afinidad similar a la de Zn(II)), afectando y/o interfiriendo en la interacción entre el ADN y HP2, ya que el plomo tiene afinidad por los grupos fosfato que sirven de unión entre el ADN y las protaminas.³²⁰

En los espectros de UV-Vis de HP2 con Pb(II) se observó una banda de TC a 360 nm característica de la coordinación Pb-tiol (Fig. 29).³¹⁷ Además junto con los datos de DC muestran que el Pb(II) se une a HP2 en sitios diferentes a los que se une el Zn(II). También proporcionan evidencia que los grupos tiol son los principales implicados en unión de Zn(II) y sugiere que HP2 puede tener otros sitios de unión para el Pb(II), posiblemente nitrógeno de His o por carboxilos, ya que el plomo también tiene afinidad por estos grupos.^{277,321,322}

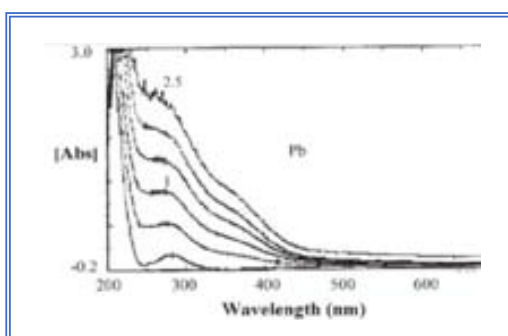


Figura 29. Espectros de UV-vis de protamina HP2 después de las adiciones de Pb(II).³¹⁷

Por lo tanto, la interacción de plomo con las protaminas que contienen zinc puede ser un posible mecanismo de la toxicidad del plomo en la reproducción masculina, que puede resultar en un daño directo a los espermatozoides, sino que incluso en la entrega directa de la sustancia tóxica al cigoto.³²³ Esto puede explicar el aumento de las tasas de infertilidad en los hombres que están ocupacionalmente expuestos a plomo.^{324,325}

5.3. Coordinación de Pb(II) a SCys en péptidos

Para un mayor entendimiento de la detoxificación metálica por parte de las proteínas, se han diseñado modelos de péptidos que se asemejan más a las metaloproteínas que los complejos inorgánicos que se habían estudiado previamente, proporcionando así un estudio más cercano a las propiedades estructurales y funcionales de los sistemas biológicos que imitan. Siendo algunos de éstos los que se describen a continuación:

➤ **Péptidos TRI**

La familia de péptidos llamados TRI son modelos peptídicos estables con sitios de unión de tiolato mononuclear, para la formación de complejos Pb-S que presentan el entorno perfecto para imitar las estructuras de Pb(II) en las proteínas.³¹⁰ Las secuencias aminoácidas de los péptidos TRIL12C y TRIL16C presentan una cisteína (ver acrónimos).

Los espectros de diferencia de UV-vis asociados con la adición de Pb(II) a TRIL16C y a TRIL12C (Fig. 30A),³¹⁰ muestran espectros similares con dos bandas: una más intensa a 260 y 278 nm ($\epsilon=17.000$ y $13.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), y otra transición más débil que aparece como un hombro, que se observa a 346 y 343 nm ($\epsilon=3.800$ y $13.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), respectivamente. Estas absorciones son análogas a las observadas en la unión Pb-CadC (Fig. 30B), indicando la formación de la especie PbS_3 con una geometría piramidal trigonal. Esto a su vez coincide con la gráfica de absorbancia en función de los equivalentes de péptidos añadidos que indican que el complejo formado tiene una relación metal/péptido de 1 a 3, $\text{Pb}(\text{pep})_3$ (Fig. 30A).

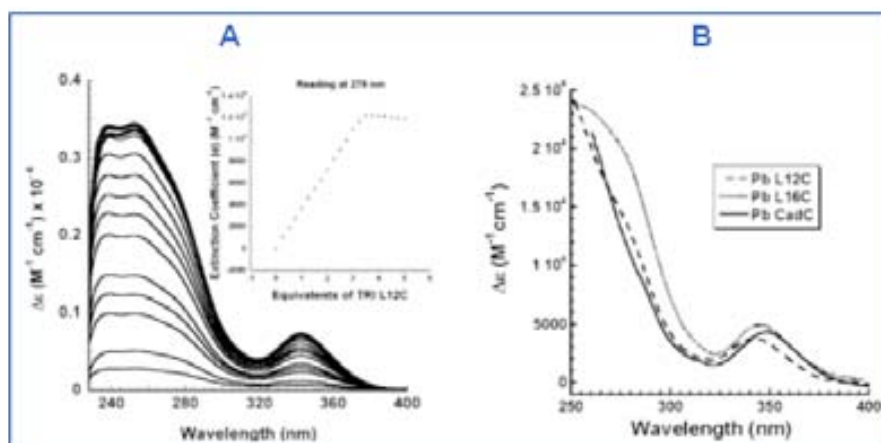


Figura 30. (A) Espectro de dif. UV-vis de Pb-TRIL12C y gráfica de coeficiente de extinción vs. eq de TRIL12C a 278 nm; **(B)** Comparación de los espectros de UV-vis de Pb-TRIL12C, Pb-TRIL16C y Pb-CadC.³¹⁰

Así también, se demostró por EXAFS que en ambos péptidos el Pb(II) se une con una estructura Pb-S_3 con distancias de Pb-S de 2.63 Å. Esto está en excelente acuerdo con las distancias encontradas para Pb-ALAD, Pb-CadC y otros modelos de complejos

de Pb-S₃.³⁰² Además, este estudio mostró un efecto del pH en la coordinación de Pb(II) a los péptidos TRI y también que esta variable influye en la preferencia por los sitios de unión del péptido, “a o d”, donde se observó que el ión Pb(II) tiene mayor afinidad por el sitio d.³¹⁰

➤ **Péptidos CoilSer**

Recientemente, se ha investigado mediante la espectroscopía de RMN de ²⁰⁷Pb el entorno de coordinación de Pb(II) (PbS₃) en sitios ricos en tiolatos, utilizando péptidos de tres cadenas plegadas en espiral, denominada familia *CoilSer* que imitan directamente el sitio estructural de la enzima de zinc, ALAD.²⁴²

Los espectros de RMN de ²⁰⁷Pb de los metalopéptidos que forman complejos homolépticos PbS₃ entorno al péptido, tienen una señal de plomo entre 5500-5800 ppm (similar a la Fig. 24). Estos desplazamientos químicos son similares a los reportados para el compuesto orgánico sintético [Ph₄As][Pb(SPH)₃] (δ=5828 ppm) que tiene una estructura PbS₃ piramidal trigonal.²²³ La posibilidad de formación de especies enlazadas a oxígeno y/o nitrógeno se puede descartar, ya que para los tipos de ligandos mixtos S, N- o S, O-dadores (PbN₂S, δ=5318 ppm; PbS₂O₂, δ=4100-4500 ppm) hay un desplazamiento químico a campo alto.^{235,237,239} Por lo tanto, la señal de ²⁰⁷Pb observada puede ser asignada con certeza a la formación de un entorno de coordinación PbS₃.

Además, en este estudio se observó que al sustituir un aminoácido estéricamente menos exigente (leucina por alanina) encima del sitio de unión al metal, sugiere que el espacio añadido por encima del plano de PbS₃, acomoda mejor el voluminoso par solitario de electrones de Pb(II) dentro del ensamblado helicoidal, conduciendo a una mayor estabilidad termodinámica de la unión de plomo. Estos resultados proporcionan la confirmación experimental de la importancia del par solitario sobre la selectividad de Pb(II) para los sitios de azufre en proteínas tales como, PbrR691 y ALAD (en donde el ión Pb(II) desplaza el Zn(II)), sugiriendo así que habrá una preferencia significativa del ión Pb(II) a ser secuestrado en un ambiente que ofrece espacio suficiente para acomodar el gran par solitario de este metal.

➤ **Glutación**

La definición de la química del glutación con Pb(II) es importante para entender la toxicidad de este metal. El glutación (GSH) es un tripéptido que contiene residuos de ácido glutámico, cisteína y glicina (γ-Glu-Cys-Gly) presentes en concentraciones milimolares (0.1 a 10 mM) en los eritrocitos,³²⁶ y es el tiol no proteico más abundante en los sistemas celulares. El GSH desempeña múltiples funciones en las células, actúa como un antioxidante, protegiéndolas de las especies reactivas de O₂ que pueden dañar

el ADN y ARN. Los metales pesados muestran una alta afinidad por el tiol de la cisteína, permitiendo que el GSH sea un quelante para estos metales en los compartimentos celulares.³²⁷

La unión de Pb(II) al glutatión³²⁸ ha sido estudiada en detalle mediante UV-vis, DC, EXAFS y RMN-¹H, pero estas técnicas no han dado una visión completa de la geometría de unión de los iones Pb(II). Uno de los estudios por cromatografía ICP-ESI-MS para sondear la especiación de los iones Pb(II) con glutatión mostró una variedad de especies incluyendo $[Pb(GS)_3]$.³²⁹ En otro estudio se observaron especies correspondientes a iones Pb(II) unidos a más de tres GSH.³²⁸ Debido a la alta entalpía de formación de enlace Pb-S,²³⁵ se cree que la coordinación de Pb-tiolato es termodinámicamente más favorable que la complejación de Pb-carboxilato. La formación del complejo PbS_3 está corroborada por la aparición de una banda de transferencia de carga del ligando al metal (TCLM) en los espectros de absorción UV-vis a 334 nm ($\epsilon \approx 3500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Fig. 31), siendo estos datos muy similares a los valores reportados en la literatura que se han expuestos anteriormente. El espectro UV-vis de $[Pb(GS)_3]^-$ a valores de pH diferentes sugieren que la disminución en la intensidad de la señal de Pb(II) es debido a la incompleta desprotonación de los tiolatos de cisteína. A pH alto, todos los tiolatos de cisteína son desprotonados y son capaces de unir Pb(II), en cambio a pH 7.0, la coordinación de todos los tiolatos de cisteína a Pb(II) es incompleta.

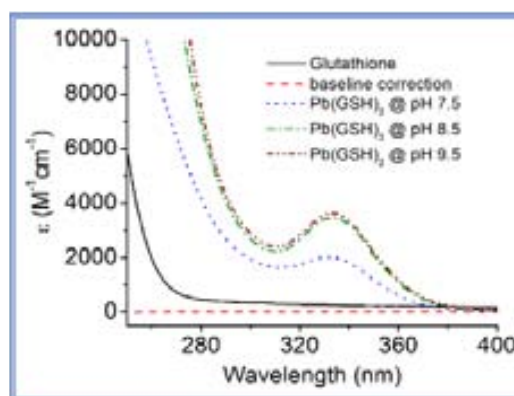


Figura 31. Espectros de UV-Vis de Pb(II) enlazado a glutatión (GSH) a diferentes pHs: 7.5 (azul), 8.5 (verde) y 9.5 (café) (restando la absorbancia del glutatión). El espectro fue registrado en TrisHCl (100 mM) a 25 °C.²⁴³

En el estudio por espectroscopía de RMN de ²⁰⁷Pb de la unión de Pb(II) a GSH bajo concentraciones fisiológicas,²⁴³ se observó una señal a 5758 ppm (a pH 9.5 y 25 °C)

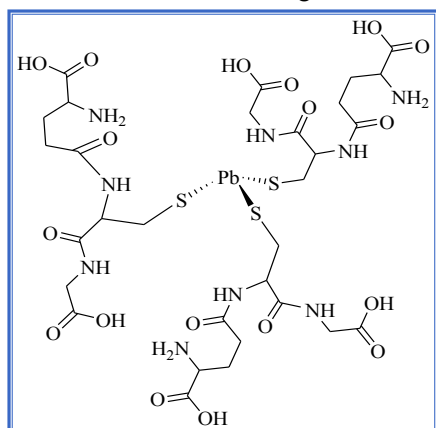


Figura 32. Propuesta de la estructura de la unión de Pb(II) al glutatión bajo condiciones fisiológicas.²⁴³

similar a una de las señales obtenidas para el sitio *d* de los TRI-péptidos en un entorno de coordinación PbS_3 .²⁴² Esto sugiere que las principales especies presentes en solución son $[Pb(GS)_3]^-$, en el intervalo de pH 7.0 a 9.5, en donde el Pb(II) está coordinado en una geometría piramidal trigonal (hemidirigida) con un par de electrones ocupando la posición apical (Fig. 32).²⁸⁶

➤ Fitoquelatinas

Otros estudios relacionados con biomoléculas que interactúan con Pb(II) son los reportados por el grupo de Mehra sobre las fitoquelatinas (PC), un tipo especial de péptidos sintetizados enzimáticamente derivados del glutatión, y con la estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$ ($n=2-11$) que se producen en algunas plantas y levaduras.^{330,331} La presencia de motivos Cys-X-Cys en su secuencia sugiere que éstas tienen características de unión metálica semejantes a las metalotioneínas, por lo cual se incluyeron en la *Clase III* de la primera clasificación de MTs. En los estudios de las fitoquelatinas, se observó la formación de diferentes complejos de Pb(II) (de 2, 3 y 4 Cys coordinando los iones Pb(II)) indicando que la coordinación de Pb(II) es dependiente de la longitud de la cadena de PC, es decir, del número de Cys disponibles. También se demostró que las fitoquelatinas de cadena larga exhiben coordinación múltiple de Pb(II), por ejemplo con la PC4, que tiene 4 Cys, se propuso la presencia de dos números diferentes de coordinación coexistentes, 2 y 4, demostrando así la mayor complejidad del sistema Pb-PC formado cuando se compara con los de Zn(II) o Cd(II).³³¹ Los espectros de UV-vis (Fig. 33-1) muestran dos absorciones, si $n=2$ Cys a 260 y 310 nm (Fig. 33-1a), si $n=3$ y 4 Cys a 250 y 330 nm (Fig. 33-1b y 1c-d).³³⁰ Además en los espectros de DC (Fig.33-2) se observan señales características dependiendo del número de Cys que coordinan el ión Pb(II), si el complejo es Pb- n_2 aparecen dos bandas positivas a 250 y 330 nm, otra negativa a 300 nm (Fig. 33-2a); para Pb- n_3 una banda a 225(+) nm, otra ancha a 290(-) y una débil a 337(+) nm (Fig. 33-2b); para Pb- n_4 dos bandas positivas a 250 y 335 nm y una negativa a 300 nm (Fig. 33-2c).

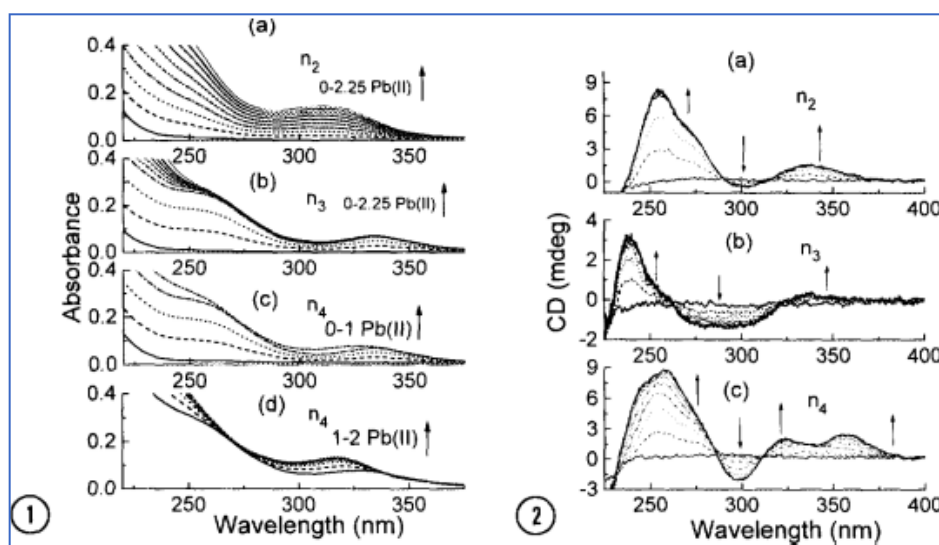
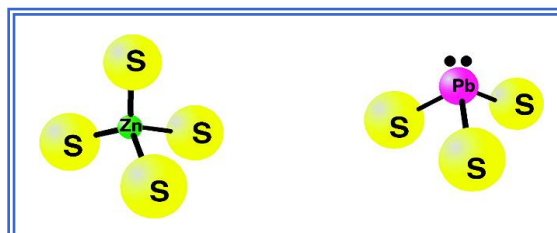


Figura 33. Espectros de (1) UV-vis y (2) DC que muestran las absorciones de la unión de Pb-PC, con diferentes números de Cys, (a) n_2 , (b) n_3 , (c) y (d) n_4 , muestras de péptidos a 20 μM tamponadas a pH 7.4.³³⁰

Así también, estos estudios mostraron por medio de los datos de DC y UV-vis, que las fitoquelatinas son capaces enlazar iones Pb(II) independientemente de cuál sea la fuente de plomo (por ejemplo, $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ o Pb-GSH).

En conclusión, la mayoría de los antecedentes bibliográficos sobre las proteínas de Zn(II), mostraron que el catión Pb(II) evita siempre que puede la coordinación Pb(II)-(SR)₄, ya que prefiere adoptar un número de coordinación de 3 con una geometría de pirámide trigonal, de manera significativamente diferente a lo que prefiere el Zn(II) (Fig. 34). Además se puede afirmar que la formación de la especie PbS_3 con geometría piramidal trigonal presenta las siguientes características: una banda característica de TC del ligando al metal (TCLM) alrededor de 330-350 nm, con una distancia de Pb-S alrededor de 2.6-2.7 Å y una señal de RMN de ²⁰⁷Pb entre 5500-5800 ppm.

Figura. 34. Estructuras de geometrías de coordinación de $\text{Zn}(\text{SR})_4$ tetraédrica y $\text{Pb}(\text{SR})_3$ de pirámide trigonal.



Posteriormente, se hará un análisis de estos datos relacionándolos con los resultados espectroscópicos obtenidos de la coordinación de Pb(II) a las MTs estudiadas en esta Tesis.

5.4. Antecedentes de la interacción del Pb(II) con metalotioneínas (MTs)

Existen datos que demuestran la interacción de Pb(II) con las MTs *in vitro*.^{52,332,333,334} Pero si bien hay diversos artículos publicados y trabajos previos realizados por este grupo de investigación que tratan dicha interacción,^{42,335} los datos aportados hasta el momento no permiten establecer sin ambigüedad los números y geometrías de coordinación de los iones Pb(II) cuando éstos se coordinan a las MTs.

Por su parte, también se debe tener en cuenta que la gran mayoría de los trabajos publicados se basan en los datos espectroscópicos, absorción UV-vis y dicroísmo circular (DC), que informan sobre las propiedades de la muestra. Esto limita claramente la importancia de los datos resultantes, y sólo se ha informado limitadamente acerca de la especiación de los sistemas Pb-MT.

De este modo, los primeros resultados basados en UV-vis y DC, relativos a la interacción Pb-MT fueron reportados en la década de 1980 por Kägi y colaboradores.³³² En donde diferentes autores han propuesto que al adicionar Pb(II) a las MTs se forman

diferentes tipos de agregados Pb-MT en función del pH de la solución y del número de iones añadidos.³³² También se ha planteado que en los complejos Pb₇-MT formados es probable que el Pb(II) adopte una geometría de coordinación tetraédrica generando cromóforos Pb(SCys)₄. Más tarde, Vašák y colaboradores estudiaron por medio de mediciones EXAFS, la coordinación de SCys en las especies Pb₇-MT propuestas, con una distancia de Pb-S de 2.65 Å,³³³ a las cuales se le asignó un número de coordinación de 2 por otros autores.³³⁴ La formación de las especies Pb₇-MT también fue propuesta por otro grupo de investigación.⁵²

Más tarde, entre los años 1999 y 2001, aparecieron una serie de publicaciones relativas a las especies Pb-MT. He y colaboradores plantearon que al añadir acetato de plomo(II) a la apo-MT2 de mamífero a pH 7.0 (Fig. 35A), se da lugar a la formación de una única especie Pb₇-MT2,³³⁶ mostrando características espectroscópicas análogas a las reportadas previamente por Kagi.³³²

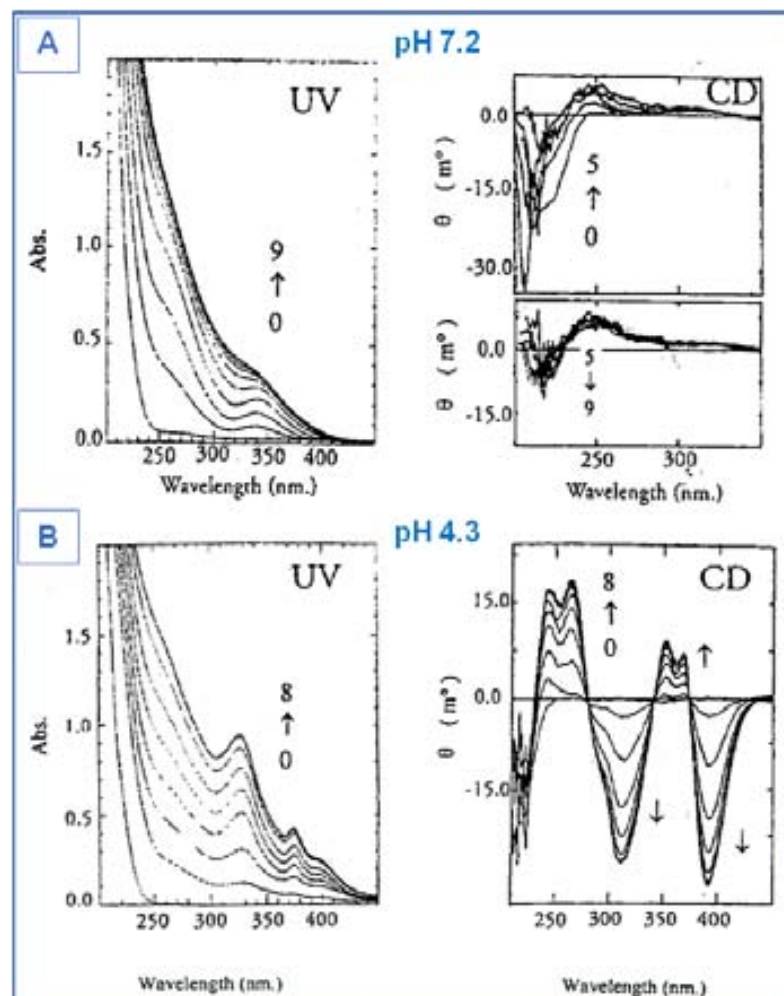


Figura 35. Espectros de DC y UV-vis de la valoración con Pb(II) de la apo-MT a pH: (A) 7.2 y (B) 4.3. (Concentración de apo-MT de 1.68×10^{-5} y 1.45×10^{-5} M, respectivamente. Se indican las adiciones de 0-9 y 0-8 eq de Pb(II)).³³⁶

Además se relacionó la formación de la especie Pb₇-MT2 con el pH, ya que a pH 4.3 se observaron señales espectroscópicas diferentes a las obtenidas a pH neutro (Fig.

35B).³³⁶ A partir de estos resultados, los autores propusieron múltiples tipos de coordinación, incluyendo la doble coordinación, basándose en los trabajos anteriores con fitoquelatinas.³³⁰ Finalmente, estos autores observaron que ambas formas de Pb₇-MT2 no pueden intercambiarse por la variación del pH.

Se debe prestar especial atención al hecho de que estos autores fueron los primeros en reportar la determinación de las constantes de unión Pb(II) a MTs mediante calorimetría de titulación isotérmica.³³⁷ En donde se estudió la interacción de acetato de Pb(II) con Zn₇-MT2 y apo-MT2 de hígado de conejo a pH 4.7. Los resultados demostraron que ambas reacciones son espontáneas y exotérmicas, con constantes de unión en el mismo orden (1.3×10^5 y 5.3×10^5 , respectivamente) y que la especie formada exhibió la misma estequiometría (Pb₇-MT), pero una estructura diferente, como se informó anteriormente. Cabe señalar que en todos estos trabajos, las propiedades del anión acetato como un agente quelante nunca fueron tomados en consideración. También se publicó que en la valoración de Zn₇-MT2 con Pb(II) a pH 4.7 se forma una única especie Pb₇-MT2 con una estructura muy similar al clúster inicial.³³⁸

En otro grupo de investigación estudiaron la interacción de Pb(II) con las isoformas de mamífero MT1 y MT2 sobre la base de los datos espectroscópicos (principalmente DC y UV-vis) y mediante el uso de distintos estados de metalación como puntos de partida: apo-MT, Zn₇-MT y Zn₂Cd₅-MT.^{339,340} Un inconveniente de este estudio es que las conclusiones a las que llegan, en cierto modo, son contradictorias. Inicialmente, se propuso que MT1 y MT2, en sus formas apo- y Zn₇-MT, se comportan de manera análoga cuando enlazan Pb(II), y que los iones Zn(II) pueden ser completamente desplazados de las especies iniciales Zn₇-MT.³⁴¹

Otro artículo de los mismos autores mostró algunas diferencias en la coordinación de Pb(II) entre las apo-MT1 y apo-MT2,³³⁹ en donde se favorece a un dominio sobre otro, en el caso de MT1 al azar, pero de forma selectiva para apo-MT2. Además, en otro estudio se observó que al añadir Pb(II) y Zn(II) a la apo-MT1 se forman especies mixtas Pb,Zn-MT1,³⁴² mientras que la apo-MT2 sólo genera especies Pb-MT2.³⁴² Así también, otras investigaciones de este grupo sugirieron que en las formas Zn₇-MT de ambas isoformas, el ión Pb(II) no desplaza el Zn(II) coordinado, pero en cambio fue capaz de hacerlo en Zn₂Cd₅-MT1 y Zn₂Cd₅-MT2, aun que de forma diferente para cada isoforma.^{340,342}

Por otra parte, se estudió la coordinación de Pb(II) a los fragmentos apo- α MT y apo- β MT en donde por medio de los datos de absorción de UV-vis, se propuso la formación de las especies Pb₄- α MT, Pb₇- α MT y Pb₃- β MT, siendo la primera especie la más estable.³⁴³

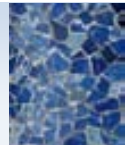
Algunos años más tarde, la disponibilidad de la técnica de ionización por electrospray en espectrometría de masas (ESI-MS), permitió un análisis más detallado de la unión de Pb(II) a la isoforma MT1 de mamífero y sus dominios independientes, α MT1 y β MT1.⁴² Aquí, la sustitución de Zn inicial de las especies Zn₇-MT1, Zn₄- α MT1 y Zn₃- β MT1 dio lugar a la formación de varias especies coexistentes, tanto hetero (Pb,Zn-MT) como homonucleares (Pb-MT). Se observó que el contenido metálico era dependiente de varios factores: el pH de trabajo (neutro o 4.5), la cantidad de Pb(II) añadido a la solución de proteína inicialmente cargada de Zn(II), y la proteína considerada (MT entera o sus dominios individuales).

Un rasgo común en todos los experimentos de ESI-MS fue la evolución de las muestras con el tiempo.³⁷ Los espectros ESI-MS sucesivos⁴² mostraron la desaparición de las especies que contienen plomo con la simultánea detección de especies Zn-MT a pH 7.0 o de las especies apo-MT en medio ácido, en un máximo de 48 horas después de la adición de Pb(II). No obstante, las huellas espectrales de DC de las muestras siguen continuamente aumentando en intensidad.³⁷ Estos resultados se ajustan con el aumento de la síntesis de MT en respuesta al ión Pb(II) cuando se administran a mamíferos, y con las dificultades encontradas en la recuperación de especies homonucleares de plomo Pb-MT en organismos.

Por último, este grupo de investigación inició el estudio de los factores que afectan el enlace de Pb(II) a MT1 de mamífero (temperatura, tiempo de estabilidad y dificultad de desplazar Zn(II)) en un trabajo previo.³³⁵

En la actualidad, y de acuerdo con la tendencia observada durante los últimos diez años en los campos de interés de la investigación sobre MTs,⁴ muchos otros estudios publicados se centran en los aspectos toxicológicos y ambientales de la relación Pb-MT. En ellos, los autores investigan el papel indiscutible de MTs y PCs en la detoxificación de los organismos expuestos a plomo con el fin de arrojar indicios sobre los procesos de desintoxicación provocados por la exposición a Pb(II), en lugar de los aspectos moleculares y/o biológicos de la interacción Pb-MT. Por lo tanto, son necesarios otros estudios para abordar estos últimos temas.³⁴⁴

II. OBJETIVOS

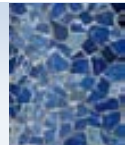


II. Objetivos

El objetivo global de esta Tesis Doctoral es investigar el comportamiento de las metalotioneínas de mamífero frente al ión Pb(II) con la finalidad de entender el posible papel de estas proteínas como agentes detoxificadores de plomo. Con este fin se ha propuesto estudiar la coordinación de Pb(II) a las cuatro isoformas de MT de mamífero, MT1, MT2, MT3 y MT4, además de sus dominios α MT y β MT (con excepción de los de MT4), todas ellas producidas de manera recombinante. Adicionalmente, se ha planteado examinar los diversos factores que determinan la formación y estabilidad de las especies Pb-MT.

Otro objetivo trazado ha sido relacionar el comportamiento de estas MTs frente a Pb(II) de acuerdo a su carácter de Zn - o Cu-tioneína, para lo cual, también se ha estudiado el comportamiento de la isoforma Cup1 de *Saccharomyces cerevisiae* frente a Pb(II), por ser una Cu-tioneína paradigmática.

III. METODOLOGÍA DE TRABAJO



III. Metodología de trabajo

1. Procedimiento general

Una vez planteados los objetivos de este trabajo hay que establecer una metodología experimental que permita alcanzarlos. Así, para una mejor comprensión de los resultados se expondrá la metodología de trabajo que se siguió en esta Tesis Doctoral, tal como se muestra en la Fig. 36.



Figura 36. Diagrama de la metodología de trabajo utilizada durante la Tesis Doctoral.

Es importante destacar que la metodología experimental utilizada en este estudio consta de dos partes claramente diferenciadas. La primera de ellas consiste en la **síntesis y caracterización de las metalotioneínas recombinantes utilizadas**, como en este caso las cuatro isoformas de mamífero (MT1, MT2, MT3 y MT4) y sus dominios constitutivos (α y β) con la excepción de los de MT4, además de la isoforma Cup1 de la levadura, *S. cerevisiae* (ver apartado IV-1. Caracterización de los complejos Zn-MT de partida). Las especies Zn-MT obtenidas *in vivo* y posteriormente caracterizadas, mediante ICP-AES, DC y absorción UV-vis, y ESI-MS, han sido el material de partida para la siguiente etapa de trabajo.

La segunda parte consiste en **estudiar la habilidad coordinante de las diferentes MTs frente a plomo(II) y además analizar los factores experimentales que puedan**

afectar dicha coordinación. Esto se llevó a cabo mediante la adición de una solución de $Pb(ClO_4)_2$ a cada una de estas proteínas, proceso que a partir de aquí denominaremos valoración (estudios *in vitro*), utilizando diferentes técnicas para el seguimiento de dicho proceso, DC, UV-vis, ESI-MS y en algunos casos, ITC.

Para realizar las valoraciones fue necesario tener en cuenta, por un lado, las restricciones experimentales de cada una de las técnicas utilizadas (rangos de concentración óptimos, temperaturas de trabajo, volumen de muestra necesario, etc.), y por otro lado, las características químicas del ión $Pb(II)$ (formación de hidroxocomplejos a pH superior a 5, elevada insolubilidad del cloruro de plomo(II), etc.). Así, las condiciones habituales de trabajo para el estudio de las MTs por las espectroscopías de DC y UV-vis, requiere la utilización de soluciones de proteína de concentración entre 10 y 20 μM , (en función del número de cisteínas que contenga la cadena peptídica) que son tamponadas a pH 4.5 y la temperatura habitual es de 25 °C. En las valoraciones con $Pb(II)$ para evitar su hidrólisis, además, es necesaria la ausencia de iones Cl^- con el fin de evitar la precipitación de $PbCl_2$, es por esto que las sales utilizadas contienen ClO_4^- como contraión. Así, el agente valorante utilizado en este trabajo ha sido una solución de perclorato de plomo(II) ($Pb(ClO_4)_2$) a pH 4.5 de concentración conocida (6990 μM), mientras que las soluciones proteicas han sido tamponadas con Tris- $HClO_4$.

A modo de exponer visiblemente las condiciones estándar de trabajo de las diferentes MTs estudiadas frente a $Pb(II)$ se ha diseñado la siguiente Tabla 1.

	MTs	Dominios α y β	Concentración (μM)	Temperatura (°C)	pH	T_{est} por eq de $Pb(II)$
MTs de mamífero	MT1		10	55	4.5	Máximo
		α MT1	20	25		
		β MT1				
	MT2		10	37	4.5	
		α MT2	20	25	7.0	
		β MT2				
	MT3		10	25	4.5	
		α MT3				
	β MT3					
MT4		10	25	4.5		
MT de levadura	Cup1		20	25	4.5	

Tabla 1. Condiciones experimentales estándar fijadas para cada una de las valoraciones con $Pb(II)$ de las MTs estudiadas.

En las valoraciones convencionales seguidas por DC y UV-vis, cada vez que se añade una cantidad de valorante, es necesario dejar un tiempo de espera para comprobar que la señal de DC es constante en el tiempo. Este “tiempo de estabilización”

(t_{est}) varía en función de diferentes factores, pero la naturaleza del metal (principalmente su labilidad) es el factor más influyente. En estudios anteriores³³⁵ se pudo observar que el t_{est} para cada equivalente de Pb(II) añadido en la valoración de Zn₇-MT1 era aproximado a las 24 horas. Es por este motivo que en el presente trabajo, al obtener tiempos de estabilización de varias horas, se han realizado experimentos a temperatura elevada para así acelerar la reacción de intercambio metálico en la proteína.

Así, por ejemplo para Zn₇-MT1, se fijó como condición estándar de trabajo una temperatura de 55 °C, y para el resto de proteínas se consideraron 25 °C, con excepción de Zn₇-MT2 (37 °C), teniendo en cuenta el t_{est} por eq de Pb(II) más corto en cada una de ellas, tal como se muestra en la Tabla 1.

2. Factores experimentales que afectan a las especies Pb-MT

Como ya se ha indicado en este trabajo, se pretende profundizar en el estudio de la interacción de Pb(II) con las MTs considerando ciertos factores experimentales que pueden afectar a la coordinación de éstas a Pb(II). Los factores a considerar fueron: concentración de la proteína, temperatura, tiempo de estabilización de cada equivalente de Pb(II) añadido y el pH de la solución de proteína. Y en algunos casos también la presencia de exceso de Pb(II).

2.1. Efecto de la variación de pH

La posible diferencia de comportamiento de las MTs a pHs diferentes viene determinada por la forma en que inicialmente se encuentren estas metaloproteínas en función del pH (holo-MT o apo-MT). En este trabajo, para estudiar el efecto del pH se han realizado las valoraciones de las MTs de mamífero (y sus dominios) y Cup1 a dos pHs diferentes: a 7.0 por ser el pH fisiológico y a pH 4.5 para evitar la formación de hidroxocomplejos de Pb(II), y se comparan ambos comportamientos.

En estos experimentos se han mantenido las otras condiciones estándar según corresponda a cada MT. Y además en algunos casos se han valorado las proteínas en otras concentraciones, 5 y 20 μM , para complementar este estudio.

En algunos casos, como MT1 y Cup1, se ha estudiado la variación de pH al final de una valoración, aumentando el pH inicial de 4.5 a 7.0. Posteriormente, se baja a pH 3.0 (o hasta obtener la forma apo-MT) y finalmente se sube el pH hasta 4.5 para observar si las especies formadas Pb-MT han recuperado su estructura inicial después de los cambios de pH, en los diferentes pHs se dejaron estabilizar las muestras para registrar los espectros.

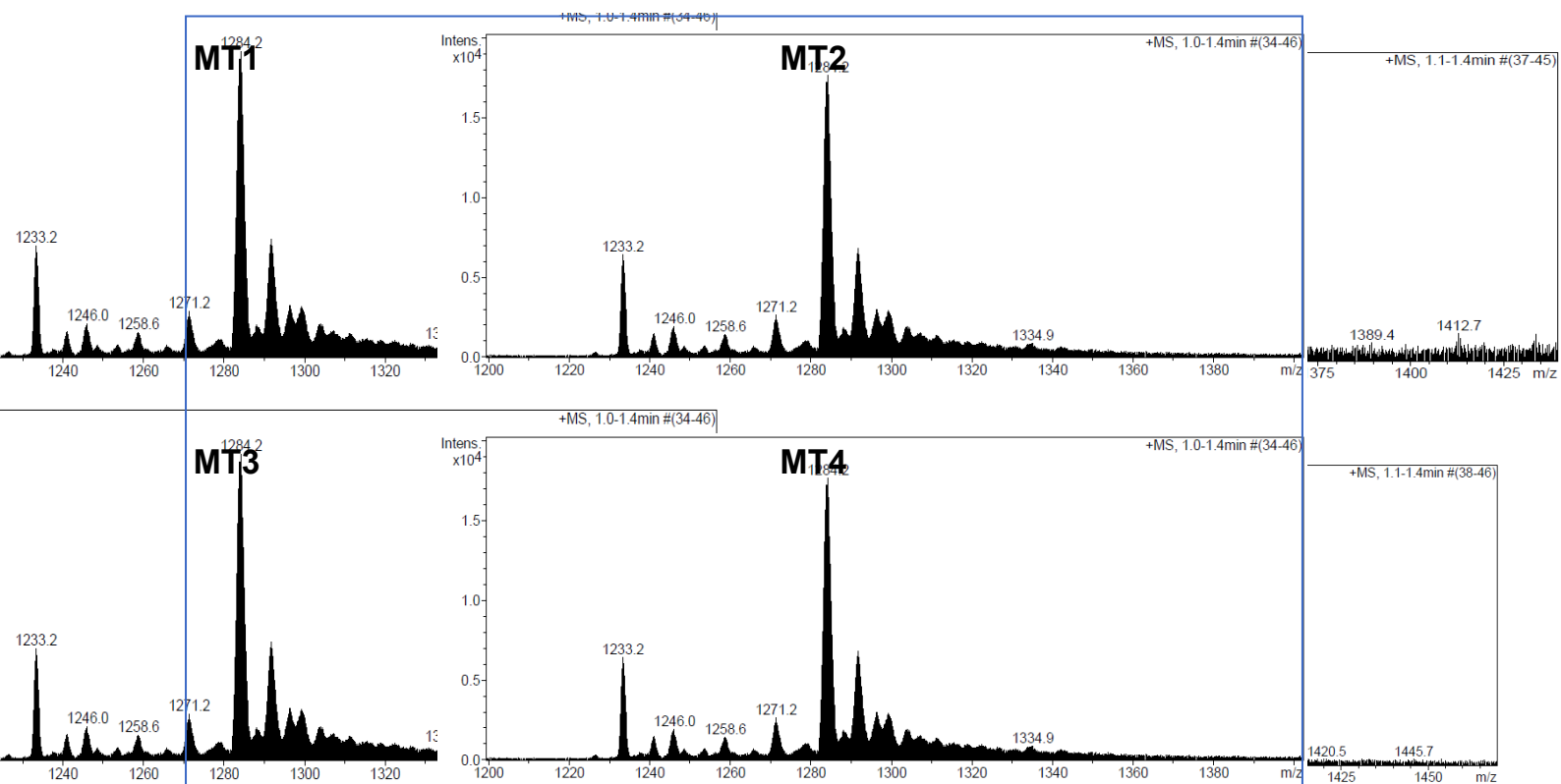


Figura 37. Espectros de masas de las isoformas de mamífero Zn-MT: -MT1, -MT2, -MT3 y -MT4, en condiciones de pH 4.5.

En condiciones de pH 7.0, las MTs de mamífero muestran una especie inicial Zn₇-MT, y es la mayoritaria en casi todos los casos (casi el 100 %) a excepción de MT3 (y Cup1) que presenta mezclas de especies (Apartado IV-1). En cambio a pH 4.5 se observó una mezcla de especies de Zn(II) (Fig. 37), desde Zn₁ hasta Zn₇, incluyendo la forma apo-MT, siendo la especie más abundante Zn₄-MT. Esto podría indicar que los sitios SCys de unión a Zn(II) tienen diferentes afinidades por este ión, liberando mayoritariamente tres iones zinc. De manera que en los experimentos realizados, tanto a pH 7.0 como a 4.5, se ha estudiado la capacidad del ión Pb(II) para desplazar el Zn(II) de la holo-proteína.

2.2. Efecto de la concentración de la proteína

En trabajos previos de este grupo de investigación, la concentración de la proteína no se había considerado nunca una variable a tener en cuenta, ya que su efecto ha sido siempre despreciable. En cambio, ya al inicio de este trabajo se detectó que al valorar Zn₇-MT1 con Pb(II) se observaba una diferencia notable en la intensidad de las absorciones de DC y en el punto de saturación de las proteínas en función de la concentración inicial de MT. Es por este motivo que se ha decidido hacer un análisis sistemático del efecto de la concentración de la proteína en su capacidad para enlazar

Pb(II). En el caso de las MTs de mamífero y de levadura se consideraron las concentraciones de 5, 10 y 20 μM .

2.3. Efecto de la temperatura

Las metalotioneínas tienen una elevada estabilidad térmica, por lo que un aumento de la temperatura no las desnaturaliza.¹⁰ Aunque se ha publicado que las reacciones de coordinación metálica en las MTs son sensibles a la temperatura en cuanto al número de iones que enlazan y a su distribución en la cadena proteica,³⁴⁵ también se considera que la temperatura a la cual se realiza una valoración es un factor que puede reducir el tiempo de estabilización por equivalente añadido, y favorecer la formación de las especies termodinámicamente más estables, pudiendo así afectar a la estequiometría metal-MT y al grado de estructuración de la proteína.

En este trabajo el efecto de la temperatura en la formación de especies Pb-MT se ha estudiado de dos metodologías:

- Comparando valoraciones realizadas en las mismas condiciones, pero a diferentes temperaturas (25 (T^a ambiente), 37 (T^a fisiológica) y 55 °C (T^a máx. estabilización)) para observar su efecto en la formación de determinadas especies.
- Y además en algunos casos, variando la temperatura después de la adición de un determinado número de equivalentes de Pb(II), con el fin de observar su efecto en la estructuración de las especies Pb-MT.

2.4. Efecto del tiempo de estabilización por equivalente de Pb(II)

A lo largo de una reacción de sustitución del metal inicialmente enlazado a una MT, el tiempo de estabilización (t_{est}) es un factor importante para estimar el tiempo necesario entre las adiciones de agente valorante, y así permitir la formación y buena conformación de las especies en solución antes de añadir un nuevo equivalente. Éste puede determinar la formación y el grado de estructuración de algunas de las especies metal-proteína.

Tradicionalmente, en las valoraciones de MTs con Cd(II), Ag(I), Cu(I), etc. no se han detectado t_{est} que excedan unos pocos minutos, pero en el caso de Pb(II) su cinética es lenta, tal y como ya se ha comentado. En trabajos previos de este grupo se encontró que los t_{est} podían ser de días. En este trabajo se ha profundizado en el estudio del tiempo requerido para que los sucesivos equivalentes de Pb(II) añadidos a las MTs de mamífero (MT1, MT2, MT3 y MT4) o bien a Cup1, dejen de provocar cambios en los espectros de DC y UV-vis de la muestra de proteína. Esta variable (t_{est}) se ha estudiado registrando los espectros (DC y UV-vis) con cierta regularidad para cada equivalente de

Pb(II) añadido para observar el tiempo real que necesitan estos iones y saber así si los tiempos afectan a la estructuración de la proteína.

Las condiciones experimentales seleccionadas para el estudio de la habilidad coordinante de las MTs frente a Pb(II) por espectroscopía de DC y UV-vis se muestran en la Tabla 2.

MTs	Dominios: α y β	Concentración (μM)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH		
<i>MTs de mamífero</i>	MT1	5	55	4.5	7.0	
		10				
		20				
		10		37	7.0	
	α MT1	20	25	4.5	7.0	
			37	7.0		
	β MT1	20	25	4.5		
			37	7.0		
			55	4.5	7.0	
	MT2	10	37	4.5	7.0	
		20	37	7.0		
		5				
		10	25	7.0		
		α MT2	20	25	7.0	
				55		
	β MT2	20	25	7.0		
37						
55						
MT3	5	37	7.0			
		55	4.5	7.0		
	10	25	4.5	7.0		
		55				
		37	7.0			
	20	55	4.5			
		37	7.0			
	α MT3	20	25	4.5	7.0	
37			7.0			
β MT3	20	25	4.5	7.0		
		37	7.0			
MT4	10	25/37/55	4.5			
		37	7.0			
		55				
<i>MT de levadura</i> Cup1	20	25	4.5	7.0		
		45	4.5			
	10	25	7.0			
		45	4.5			
	5	25	7.0			
		45	4.5			

Tabla 2. Condiciones experimentales de cada una de las valoraciones con Pb(II) de las MTs estudiadas en este trabajo y seguidas por DC y UV-vis realizadas para responder a nuestros objetivos. El t_{est} por eq de Pb(II) en todas las valoraciones fue el máximo.

A modo de complementar la información sobre la coordinación de Pb(II) a las MTs proporcionada por los datos espectroscópicos, se han utilizado otras dos técnicas antes mencionadas: ESI-TOF-MS e ITC, las cuales requieren algunas condiciones específicas de trabajo.

En los experimentos por ESI-MS (Tabla 3), se prepara la solución de la proteína a pH 7.0 y se añade una cantidad específica de equivalentes de Pb(II), ya sea igual al número de iones Zn(II) coordinados a la MT o un exceso de Pb(II) y se realiza un estudio de la evolución de las especies formadas respecto al tiempo, y la temperatura de trabajo es de 25 y/o 37 °C. En los espectros de masas obtenidos se observan picos de baja intensidad que corresponden a los aductos de amonio y perclorato, frecuentes en ESI-MS cuando se utilizan sales que contienen estos iones, y como son muy numerosos, no se han señalado como especies en los espectros finales. Esta técnica nos complementa los resultados obtenidos por DC y UV-vis en similares condiciones, dándonos información sobre las especies Pb-MT que se forman en cada proteína y cuál de ellas son las más estables.

MTs	Dominios α y β	Concentración (μ M)	Temperatura (°C)	pH	N° de eq de Pb(II)	T _{est} por eq de Pb(II)	
<i>MTs de mamífero</i>	MT1	10	37	7.0	10	8 h	
		10	25	7.0	7/35	24 h	
	α MT1	20	25	7.0	4/16	12 h	
		β MT1	20	25	7.0		3/12
	MT2		10	37	7.0	10	24 h
			10	25	7.0	7/35	
		α MT2	20	25	7.0	4/16	12 h
		β MT2	20	25	7.0	3/12	
	MT3		10	37	7.0	10	24 h
			10	25	7.0	7/35	
		α MT3	20	25	7.0	4/16	12 h
		β MT3	20	25	7.0	3/12	
MT4		10	37	7.0	10	8 h	
<i>MT de levadura</i>	Cup1	10	25	7.0	4/12	24 h	

Tabla 3. Condiciones experimentales para el estudio por ESI-TOF-MS del comportamiento de las MTs de este trabajo frente a Pb(II).

Así también, la técnica de ITC nos ha proporcionado información sobre el número de equivalencia de Pb(II) y los parámetros termodinámicos correspondientes al intercambio de los iones Zn(II) enlazados a la MT, por Pb(II). En estos experimentos de microcalorimetría (Tabla 4) se ha preparado una solución de proteína a pH 4.5 para evitar la posible precipitación de la muestra en la celda a la cual se le inyectan

paulatinamente los equivalentes de Pb(II) (volumen de inyección de 7 μL de una solución de $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$ de concentración 1200 μM) en un tiempo específico (cada 180 s), esta valoración suele ser más rápida que las estudiadas por DC y UV-vis.

Finalmente, dentro de los diferentes factores experimentales que pueden afectar la capacidad coordinante de las MTs frente a Pb(II), se han considerado las condiciones de los medios fisiológicos, ya que éstas nos permiten comprender qué sucedería para cada MT en condiciones lo más semejantes a un entorno biológico. Éstas son: concentración de proteína de 10 y 20 μM , respectivamente para la MT entera y los fragmentos a pH 7.0 (pero siempre evitando la posible precipitación del plomo), a una temperatura de 37 $^\circ\text{C}$, y el máximo t_{est} por equivalente de Pb(II) añadido para las técnicas de DC y UV-vis. (Tabla 2). Además para mayor profundización en el estudio de la interacción de Pb(II) a las MTs en condiciones fisiológicas se realizaron experimentos por ESI-TOF-MS (Tabla 3), en donde a una solución 10 μM de cada una de las isoformas de MT de mamífero estudiadas se le añaden 10 eq de Pb(II), por ser una cantidad superior a la de los iones Zn(II) coordinados inicialmente a cada una de las MTs y se sigue la evolución de las especies que se forman respecto al tiempo.

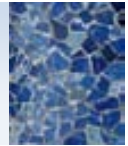
MTs	Dominios α y β	Concentración (μM)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	pH	T_{est} por adición de eq de Pb(II)(seg.)	
MTs de mamífero	MT1	5	55	4.5	180	
		10				
	α MT1	20	25	4.5		
	β MT1	20	25	4.5		
	MT2	10	37	4.5		
	MT3	10	25	4.5		
		α MT3	20	25		4.5
		β MT3	20	25		4.5
	MT4	10	37	4.5		
	MT de levadura	Cup1	10	45		4.5

Tabla 4. Condiciones experimentales para el estudio por ITC del comportamiento de las isoformas de MTs frente a Pb(II).

A pesar que los dominios α y β de las isoformas de mamífero no existen de manera independiente en los organismos, éstos también se estudiaron para ver cómo interactúan en la proteína entera en estas condiciones, para así complementar la información obtenida, pudiendo así conocer más sobre el mecanismo de detoxificación frente a Pb(II), así como la especie Pb-MT que se forma en cada uno de ellos.

Una vez realizados todos estos experimentos se puede llegar a una mejor comprensión de cómo se comportan estas MTs frente a Pb(II) en las distintas condiciones y de manera global, siempre teniendo en cuenta que todas las comparaciones e interpolaciones de los datos dependerán de los factores que afectan a cada proteína.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



IV. Resultados y Discusión

1. Caracterización de los complejos Zn-MT de partida

En este apartado se muestran los resultados obtenidos correspondientes a la caracterización de las diversas proteínas recombinantes utilizadas en el presente trabajo: las isoformas MT1, MT2, MT3 y MT4 de *ma mífero* y sus correspondientes dominios por separado, α y β (a excepción de MT4); y una de las isoformas de MT de la levadura *S. cerevisiae*, Cup1. Todas ellas fueron sintetizadas por el grupo de la Dra. Silvia Atrian, del Departamento de Genética Molecular, Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, mediante técnicas de ingeniería genética, utilizando cultivos de "*Escherichia coli*" en medios enriquecidos con Zn(II).

De esta manera en esta Tesis, las especies Zn-MT así obtenidas se han denominado especies *in vivo* y para su caracterización se han utilizado diversas técnicas analíticas, tanto espectroscópicas (ICP-AES, DC y UV-visible) como de espectrometría de masas (ESI-MS), obteniendo un conjunto de resultados que se muestran en el anexo 2.

1.1. Zn-MT1 y sus dominios Zn- α MT1 y Zn- β MT1

La síntesis de la isoforma MT1 en medios ricos en Zn(II) da lugar a una única especie, Zn₇-MT1 (Tabla 5), tal y como se observa en el espectro de ESI-MS. Su espectro de DC muestra una única banda en forma de *exciton coupling*, centrada a 240 nm, característica de la absorción del cromóforo Zn(Cys)₄.

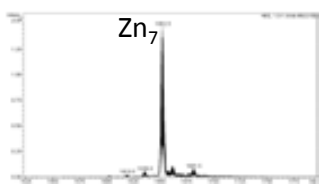
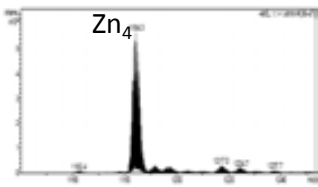
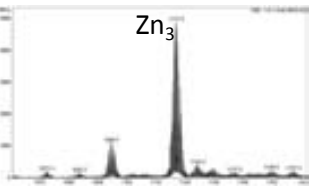
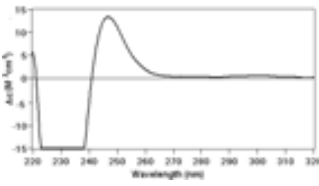
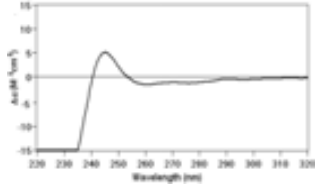
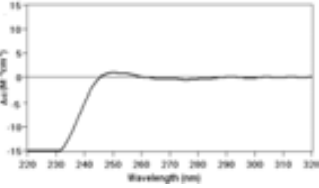
		MT1	α MT1	β MT1
ICP-AES	[prot](M)	$2.97 \cdot 10^{-4}$	$1.33 \cdot 10^{-4}$	$1.58 \cdot 10^{-4}$
	Zn/MT	6.99	4.29	2.33
ESI-MS				
				
DC				
				

Tabla 5. Resultados de la caracterización de las producciones de MT1, α MT1 y β MT1 en medios ricos en Zn(II), en condiciones de pH 7.0 y 25 °C.

La síntesis del fragmento α MT1 da lugar a la formación de una única especie, Zn_4 - α MT1, por su parte, en el fragmento β MT1 se observa una mezcla de especies, siendo Zn_3 - β MT1 la mayoritaria, mientras que Zn_2 - y Zn_1 - β MT1 también fueron detectadas por espectrometría de masas. Los espectros de DC de ambas preparaciones muestran una única banda similar a la de la proteína entera, correspondiente al cromóforo de $Zn(Cys)_4$. La cuantificación del contenido metálico de estas preparaciones mediante ICP-AES está de acuerdo con las especies observadas por ESI-MS.

1.2. Zn-MT2 y sus dominios Zn- α MT2 y Zn- β MT2

La síntesis de la isoforma MT2 en medios ricos en Zn(II) da lugar a una mezcla de especies, siendo Zn_7 -MT2 la mayoritaria, mientras que Zn_6 - y Zn_5 -MT2 (menor al 3% de abundancia) también fueron detectadas por ESI-MS (Tabla 6). Su espectro de DC muestra una única banda en forma de *exciton coupling*, centrada a 240 nm, característica de la absorción del cromóforo $Zn(Cys)_4$. La síntesis de los fragmentos α MT2 y β MT2 dan lugar a la formación de una única especie, Zn_4 - α MT2 y Zn_3 - β MT2, respectivamente, tal y como se observa en los espectros de masas. Los espectros de DC de ambas preparaciones muestran una única banda análoga a la observada en la proteína entera, correspondiente al cromóforo de $Zn(Cys)_4$. La relación metálica Zn/MT de estas proteínas mediante ICP-AES se corrobora con las especies observadas por ESI-MS.

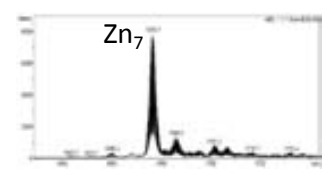
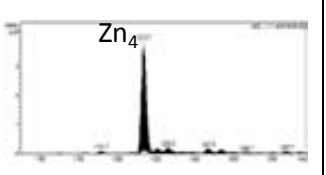
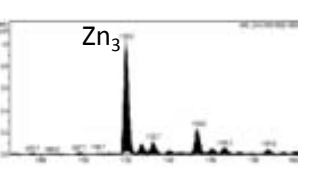
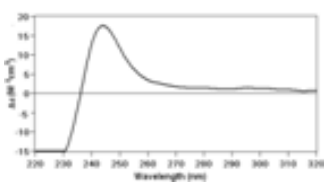
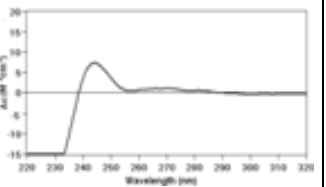
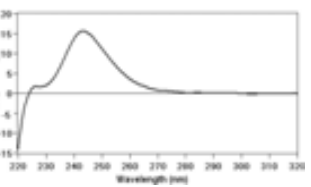
		MT2	α MT2	β MT2
ICP-AES	[prot](M)	$0.38 \cdot 10^{-4}$	$0.93 \cdot 10^{-4}$	$1.10 \cdot 10^{-4}$
	Zn/MT	6.53	3.88	3.05
ESI-MS				
	DC			

Tabla 6. Resultados de la caracterización de las producciones de MT2, α MT2 y β MT2 en medios ricos en Zn(II), en condiciones de pH 7.0 y 25 °C.

1.3. Zn-MT3 y sus dominios Zn- α MT3 y Zn- β MT3

La síntesis de la isoforma MT3 en medios ricos en Zn(II) da lugar a una mezcla de especies, siendo Zn_7 -MT3 la mayoritaria, mientras que Zn_6 - y Zn_5 -MT3 también fueron detectadas por ESI-MS (Tabla 7). Su espectro de DC muestra una única banda en

forma de *exciton coupling*, centrada a 240 nm, característica de la absorción del cromóforo $Zn(Cys)_4$. La síntesis de los fragmentos α MT3 y β MT3 dan lugar a la formación de una única especie, Zn_4 - α MT3 y Zn_3 - β MT3, respectivamente, tal y como se observan en los espectros de masas. Los espectros de DC muestran una única banda semejante a la observada en la proteína entera correspondiente al cromóforo de $Zn(Cys)_4$. Las especies observadas por ESI-MS coinciden con la cuantificación del contenido metálico en Zn(II) de estas preparaciones mediante ICP-AES.

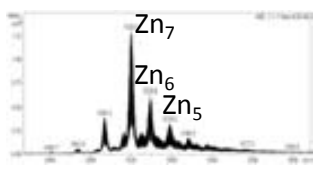
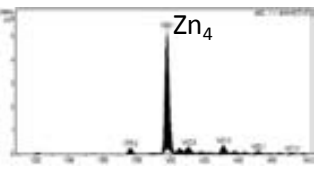
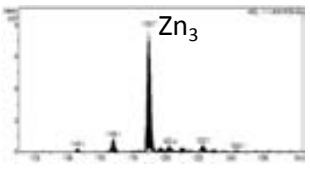
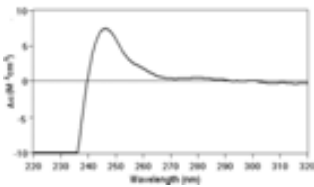
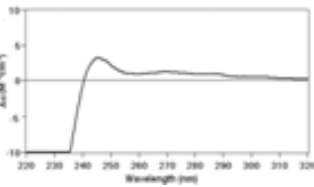
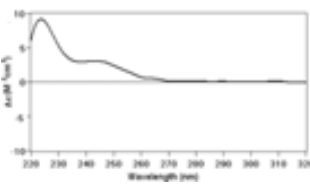
		MT3	α MT3	β MT3
ICP-AES	[prot](M)	$1.18 \cdot 10^{-4}$	$2.32 \cdot 10^{-4}$	$1.72 \cdot 10^{-4}$
	Zn/MT	7.58	4.52	3.13
ESI-MS				
	DC			

Tabla 7. Resultados de la caracterización de las producciones de MT3, α MT3 y β MT3 en medios ricos en Zn(II), en condiciones de pH 7.0 y 25 °C.

1.4. Zn-MT4

La síntesis de la isoforma MT4 en medios ricos en Zn(II) da lugar a una mezcla de especies, siendo Zn_7 -MT4 la mayoritaria, mientras que Zn_9 -, Zn_8 - y Zn_6 -MT4 (menor al 5% de abundancia) también fueron detectadas por ESI-MS (Tabla 8). Su espectro de DC no muestra ninguna absorción por encima de 240 nm, mostrando una huella espectral similar a la que se observa para las formas apo-MT. La cuantificación del contenido metálico de esta proteína mediante ICP-AES está de acuerdo con la especie observada por espectrometría de masas.

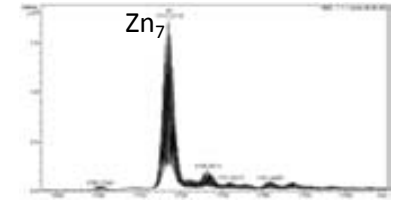
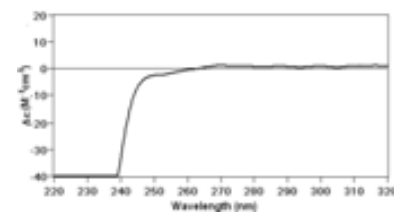
		MT4
ICP-AES	[prot](M)	$0.18 \cdot 10^{-4}$
	Zn/MT	7.40
ESI-MS		
	DC	

Tabla 8. Resultados de la caracterización de las producciones de MT4 en medios ricos en Zn(II), en condiciones de pH 7.0 y 25 °C.

1.5. Zn-Cup1

La síntesis de la isoforma Cup1 de levadura en medios ricos en Zn(II) da lugar a una mezcla de especies, siendo Zn₄- y Zn₃-Cup1 las mayoritarias, mientras que Zn₂-Cup1 también fue detectada por ESI-MS (Tabla 9). Su espectro de DC no muestra absorción por encima de 240 nm, mostrando una huella espectral similar a la que se observa para las formas apo -MT y a Zn₇-MT4. La relación metálica Zn/MT de esta proteína cuantificada mediante ICP-AES está de acuerdo con las especies observadas en el espectro de masas.

		Cup1
ICP-AES	[prot] (M)	3.93 · 10 ⁻⁴
	Zn/MT	2.89
ESI-MS		
DC		

Tabla 9. Caracterización de la producción de Cup1 en medios ricos en Zn(II), en condiciones de pH 7.0 y 25 °C.

2. Estudio de la habilidad coordinante de las diferentes isoformas de MT de mamífero, sus dominios α y β , y la isoforma Cup1 de levadura frente a Pb(II)

Durante esta Tesis Doctoral se ha realizado un conjunto de experimentos que han permitido observar que hay una serie de factores que pueden influir en la coordinación de Pb(II) a las isoformas de MT estudiadas. Cabe destacar que algunas de estas variables, como el pH, ya habían revelado su influencia en la coordinación de los iones metálicos,^{335,336} pero otras, como la concentración de proteína o la temperatura a la que se realiza el experimento, aún no habían sido consideradas. A continuación se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la interacción del catión Pb(II) con cada una de las MTs estudiadas en esta Tesis, principalmente por espectroscopías de DC y UV-vis en las diferentes condiciones experimentales escogidas. Además se ha complementado dicho estudio mediante espectrometría de masas (ESI-MS) y microcalorimetría (ITC). Una vez descritos y discutidos los resultados de los diferentes experimentos, se hará un análisis global de la habilidad coordinante de cada una de las MTs frente a Pb(II). Las condiciones experimentales de todos los experimentos realizados se encuentran recogidas en las Tablas 2, 3 y 4 en el apartado *III. Metodología de trabajo*.

2.1. Habilidad coordinante de la isoforma MT1 de mamífero y sus dominios α y β frente a Pb(II)

2.1.1. Isoforma MT1 de mamífero

2.1.1.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis

En estudios anteriores³³⁵ se observó que el tiempo de estabilización necesario para que las señales de dicroísmo no variaran al añadir diferentes equivalentes de Pb(II) a Zn₇-MT1 a temperatura ambiente eran demasiado largos, más de 24 horas. Así también, otra condición experimental ya ensayada anteriormente, fue trabajar a pH 4.5 porque así se evita la precipitación de PbO, insoluble a pH neutro.²¹⁴ En base a estas observaciones experimentales, se ha decidido trabajar a temperaturas elevadas para disminuir el t_{est} de cada equivalente de Pb(II) añadido a Zn₇-MT1, realizando una valoración a 55 °C, y manteniendo el pH ácido como punto de partida.

A continuación, para un mayor entendimiento del estudio de la habilidad coordinante de Zn₇-MT1 frente al ión Pb(II) mediante las técnicas espectroscópicas de DC y UV-vis, se presentan las condiciones experimentales de las valoraciones de Zn₇-MT1 con Pb(II)

(Tabla 10). Este análisis se iniciará a partir de los resultados obtenidos en las condiciones estándar de trabajo, concentración 10 μ M, pH 4.5 y 55 °C, y éstos se compararán con los obtenidos a pH 7.0. Luego se discutirán las valoraciones de concentraciones 20 y 5 μ M de proteína a ambos pHs. Por último, se analizará la valoración en condiciones similares a las fisiológicas.

Concentración (μ M)	Temperatura (°C)	pH	
10	55	4.5	7.0
20			
5			
10	37	7.0	

Tabla 10. Condiciones experimentales de las valoraciones de Zn₇-MT1 con Pb(II) para el estudio espectroscópico de DC y UV-vis.

El análisis de los datos espectroscópicos obtenidos en la valoración de Zn₇-MT1 con Pb(ClO₄)₂ en las condiciones estándar de trabajo evidenció la coordinación de Pb(II) a la isoforma MT1, observándose la aparición de diversas absorciones muy intensas y características, tanto en los espectros de DC como en los de UV-vis (Fig. 38, Tabla 11). El conjunto de datos espectroscópicos recogidos indica una variación de los espectros desde la adición del 1° eq de Pb(II) hasta llegar a la saturación para el 5° eq de Pb(II). Los espectros alcanzan su máxima intensidad tras la adición de 5 iones plomo(II), mientras que las adiciones posteriores no modifican la forma y la intensidad de los espectros, es decir, la muestra de proteína mantiene la quiralidad de las especies Pb-MT1 formadas.

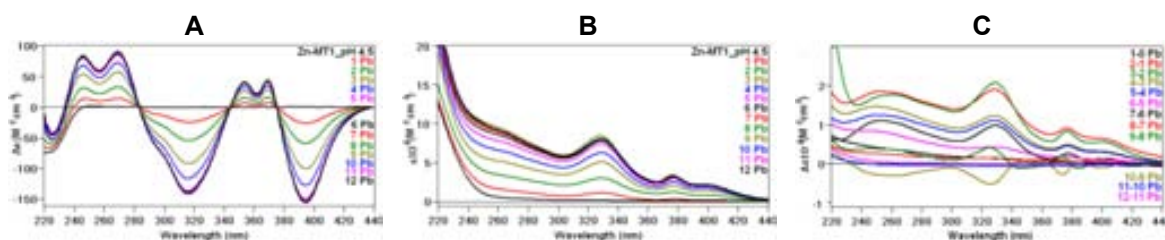


Figura 38. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT1 a pH 4.5 y 55 °C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

DC	UV-vis	dif. UV-vis
225(-), 245-270(+), 317(-), 354-370(+), 395(-) nm	250, 330, 375, 400 nm	250, 330, 375, 400 nm

Tabla 11. Absorciones correspondientes a los espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT1 a pH 4.5 y 55 °C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 38A) muestran principalmente siete máximos (positivos y negativos). Estas señales, presentes desde el inicio de la valoración, aumentan su

intensidad a medida que se adicionan los sucesivos equivalentes de plomo(II) a Zn₇-MT1, mediante tres puntos isodicroicos a 285, 347 y 385 nm, que podrían indicar un proceso cooperativo en la coordinación del ión Pb(II) a la proteína. La elevada intensidad de los espectros registrados indica un elevado grado de plegamiento de MT1 y la formación de clústeres Pb-MT1 muy estructurados, y por ende, se entiende que hay una mayor quiralidad en las nuevas especies de Pb(II) formadas que en las iniciales de Zn-MT1.

Los espectros de UV-vis registrados durante la citada valoración (Fig. 38B) muestran un comportamiento similar al observado por dicroísmo circular. Estos espectros se caracterizan por mostrar unas bandas anchas atribuidas al enlace Pb-MT1, que permiten diferenciar cuatro absorciones (250, 330 (más intensa), 375 y 400 nm), que desde el 1° eq de Pb(II) reflejan un aumento de la absorción en el rango de longitudes de onda entre 200 y 420 nm, tal como se puede observar en la gráfica de absorbancia (a 250 y 330 nm) vs. eq de Pb(II) añadidos a Zn₇-MT1 (Fig. 39).

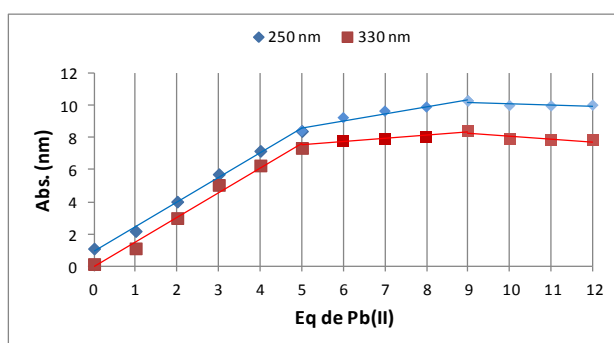


Figura 39. Gráficas de absorbancias vs. eq de Pb(II) a 250 (línea azul) y 330 (línea roja) nm, de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT1 a pH 4.5 y 55 °C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Por su parte, el análisis de los espectros de dif. UV-vis registrados (Fig. 38C) ha revelado que la contribución por equivalentes de plomo(II) añadidos a Zn₇-MT1 muestran absorciones análogas. Pero tras la adición del 6° eq de Pb(II) estas señales disminuyen en intensidad, por lo que ya no se observan las cuatro bandas tan definidas como las observadas para los anteriores iones añadidos, sino que aparecen levemente más desplazadas, que podría indicar un cambio en la coordinación de los iones Pb(II) incorporados a Zn₇-MT1 o en el entorno de coordinación de estos centros metálicos, así como en un ordenamiento de la proteína frente a estos iones.

Por lo tanto, la aparición de las cuatro absorciones correspondientes al enlace Pb-MT1: 250, 330 (más intensa), 375 y 400 nm se da preferentemente hasta el punto de saturación de las señales (del 1° hasta el 5° eq de Pb(II)) (Fig. 40), así para una mayor comprensión de la lectura de esta Tesis, a estas señales se les denominarán de “*tipo I*”, tal como se puede ver en la Fig. 40A, y a nuevos grupos de absorciones que puedan aparecer a lo largo de este estudio se les asignará de manera consecutiva.

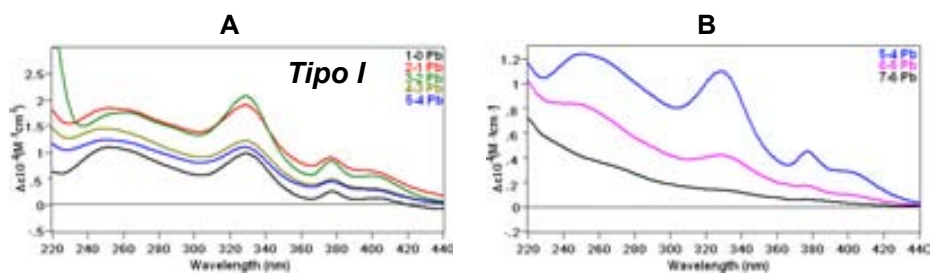


Figura 40. Espectros de dif. UV-vis registrados durante la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT1 con Pb(II) a 55 °C y pH 4.5, donde se muestran las absorciones denominadas (A) *tipo I* y (B) la evolución de las absorciones por eq de Pb(II).

Una vez evidenciada la coordinación de los iones Pb(II) a Zn₇-MT1 a 55 °C y pH 4.5, y por consecuencia, la formación de los clústeres Pb-MT1, se ha decidido estudiar si estas especies son estables en función del pH.

Para investigar dicha estabilidad, se realizó la valoración de Zn₇-MT1 en condiciones estándar (10 μ M, 55 °C y pH 4.5) añadiendo hasta el 5° eq de Pb(II) para completar la saturación de la proteína, y posteriormente, se aumentó el pH inicial (4.5) a 7.0, sin observarse el plomo en solución (Fig. 41). Esta variación de pH provocó la disminución de la intensidad de las señales, indicativo de la pérdida de calidad de las especies formadas. Al cabo de 1 hora se bajó el pH de la misma solución hasta un valor de 3.0 para obtener la forma apo-MT, tal como sucede en la mayoría de las metalotioneínas, pero en este caso la desestructuración de los complejos Pb-MT sólo se observó a pH inferior a 1.5, momento en que se registró un espectro prácticamente plano, correspondiente a la forma desmetalada, apo-MT1.

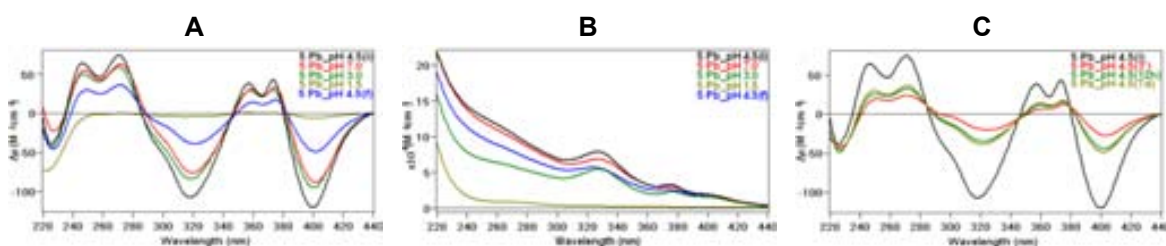


Figura 41. Espectros de (A y C) DC y (B) UV-vis registrados a lo largo de la variación del pH: 4.5 inicial – 7.0- 3.0 -1.5- 4.5 final de la valoración de la solución 10 μ M de Zn₇-MT1 hasta 5 eq de Pb(II) añadidos, a 55 °C.

Posteriormente, se aumentó el pH hasta 4.5 y se observó un espectro análogo al registrado inicialmente al mismo pH, si bien con intensidad más baja, revelando una cierta pérdida de la estructuración de los complejos presentes a este pH. Para esta misma solución, cuando se registraron los espectros al cabo de siete días, se observó que la señal espectral aún no alcanzaba la intensidad de las absorciones iniciales, indicando que la variación de pH provocó una pérdida de estructuración irreversible. Estos resultados muestran que, el pH de la solución Zn₇-MT1 puede influir en la

estructuración de los clústeres Pb-MT1 formados al añadir Pb(II) a la solución, independiente del tiempo de estabilización.

En base a los datos recogidos, se realizó una valoración manteniendo la concentración y temperatura consideradas estándar ($10 \mu\text{M}$, $55 \text{ }^\circ\text{C}$), pero a pH 7.0 (Fig. 42). Los resultados obtenidos en estas nuevas condiciones experimentales permitieron observar en los espectros de DC y UV-vis la aparición de absorciones similares a las observadas a pH 4.5, pero éstas presentan una evolución espectral diferente a la mostrada para la valoración a pH 4.5.

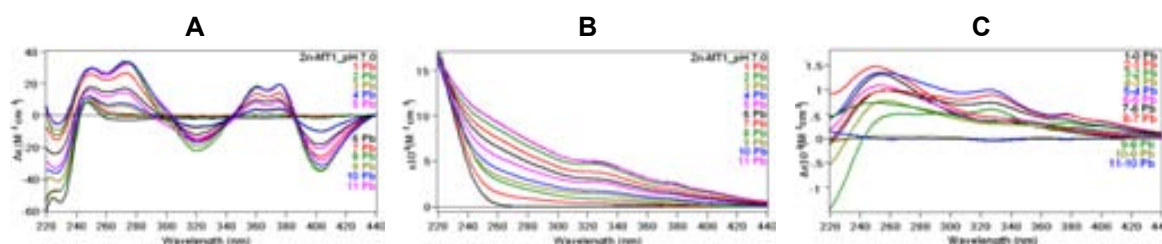


Figura 42. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución $10 \mu\text{M}$ de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ a pH 7.0 y $55 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta 11 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

La evolución de los espectros de DC y UV-vis muestra la saturación de las señales alrededor de 9° eq de Pb(II), siendo esta diferente a la observada a pH 4.5 que se da para 5° eq de Pb(II). Esta diferencia puede tener relación con el hecho de que a pH 4.5 los iones Zn(II) están enlazados más débilmente a los azufres cisteínicos (SCys), siendo la especie más abundante $\text{Zn}_4\text{-MT1}$, por pérdida de algunos iones Zn(II). En cambio, a pH 7.0 el enlace Zn-SCys es más fuerte, por lo que la descoordinación de Zn(II) de la proteína está más impedida y por consecuencia, la entrada de los iones Pb(II) es más lenta.

En los espectros de DC de la valoración de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ a pH 7.0 (Fig. 42A), la adición del 1° y 2° eq de Pb(II) no provocan prácticamente la aparición de nuevas señales, sino que éstas aparecen a partir del 3° eq de Pb(II), dando lugar a siete absorciones similares a las observadas a pH 4.5, pero disminuidas en intensidad y con menos puntos isodicroicos. Además, los espectros de UV-vis (Fig. 42B) sólo muestran visiblemente tres absorciones (250, 330 y 375 nm) menos intensas, donde se destaca casi ausencia de la absorción a 400 nm observada a pH ácido, sin embargo ésta sí se percibe en los espectros de dif. UV-vis.

En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 42C) se observó que la contribución por cada equivalente de Pb(II) enlazado a la proteína es diferente al mostrado a pH 4.5. En la Fig. 43A se puede apreciar que la incorporación del 1° y 2° eq de Pb(II) a la proteína muestran dos absorciones a 250 y 350 nm que corresponden al enlace Pb-MT1 que

denominaremos de “*tipo II*”. Estas señales coinciden con las observadas en la coordinación de Pb(II) a las proteínas de Zn(II) (ALAD, dedos de zinc, CadC) en donde preferentemente el ión Pb(II) se coordina por medio de tres Cys en una geometría piramidal trigonal, Pb-SCys₃, que provoca la aparición de dos absorciones alrededor de 250 y 340 nm (Fig. 23, apartado I. Introducción).

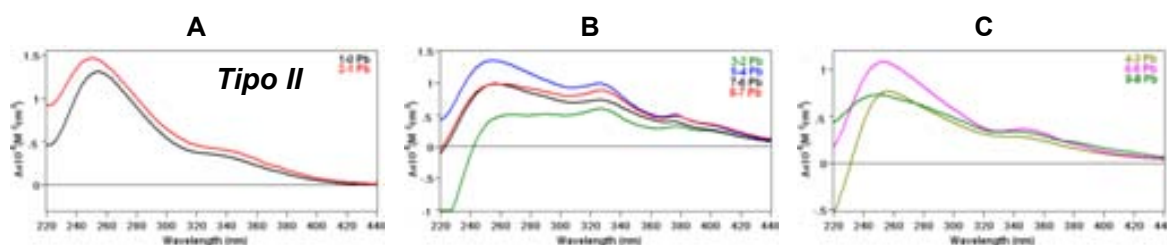


Figura 43. Espectros de dif. UV-vis de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT1, a pH 7.0 y 55 °C, que muestran las absorciones formadas por cada eq de Pb(II) añadido: (**A** y **C**) *tipo II* (250 y 350 nm); y (**B**) *tipo I* (250, 330, 375 y 400 nm).

En cambio, la adición del 3°, 5°, 7° y 8° eq de Pb(II) provocan la aparición de las absorciones de *tipo I* (250, 330 (más intensa), 375 y 400 nm), como se puede observar en la Fig. 43B. Estos datos revelan que ambos tipos de absorciones, ya sean *I* o *II*, son característicos del enlace Pb-MT1. Así también, en estas valoraciones se ha podido observar que la aparición de estas bandas tienen directa relación con el aumento (o variación) en la intensidad de las señales de DC, provocadas por la adición de cada uno de estos equivalentes de Pb(II). Este fenómeno de variación de las absorciones, podría ser indicativo de la formación de diferentes tipos de coordinación a lo largo de la valoración, y al parecer provocan que las señales del UV-vis no sean tan intensas y definidas como las observadas en la valoración a pH 4.5.

Teniendo en cuenta el conjunto de datos obtenidos mediante los análisis espectroscópicos de DC y UV-vis de las valoraciones de las soluciones 10 μ M de Zn₇-MT1 a 55 °C, a pH 4.5 y pH 7.0, se ha evidenciado una diferencia en la evolución de las absorciones de cada equivalente añadido. Además las intensidades de las señales (DC y UV-vis) son dependientes del pH, siendo éstas más intensas a pH ácido que a pH neutro. Esto nos indica que el proceso de formación de los clústeres Pb-MT1 es diferente para ambos pHs, y por tanto, la interacción y la estabilidad de los iones Pb(II) está influenciada por el pH en el que se encuentre la proteína (ver apartado 3).

Otro de los factores que se ha estudiado es la concentración de Zn₇-MT1, para así conocer el efecto que pueda tener en la interacción de los iones Pb(II) con una solución de proteína más, o menos concentrada. Para esto se realizaron valoraciones a una mayor y menor concentración (de la considerada óptima de trabajo, 10 μ M) de Zn₇-MT1, 20 y 5 μ M respectivamente, manteniendo las otras condiciones, pH 4.5 y 55 °C.

En los espectros de DC y UV-vis de la valoración a 20 μM (Fig. 44A-B), se observan las mismas absorciones que para 10 μM , pero son levemente más intensas. Las señales espectroscópicas de DC se saturan para el 5° eq de Pb(II) añadido, pero en cambio en el UV-vis la saturación se da para el 9° eq de Pb(II). En los espectros de dif. UV-vis, se observa la aparición de las absorciones características de *tipo I*, desde la adición del 1° hasta el 5° eq de Pb(II), de manera similar que a 10 μM . En las siguientes adiciones de Pb(II) se observaron las señales de *tipo II* (250 y 350 nm), como en algunos casos anteriores (Fig. 44C).

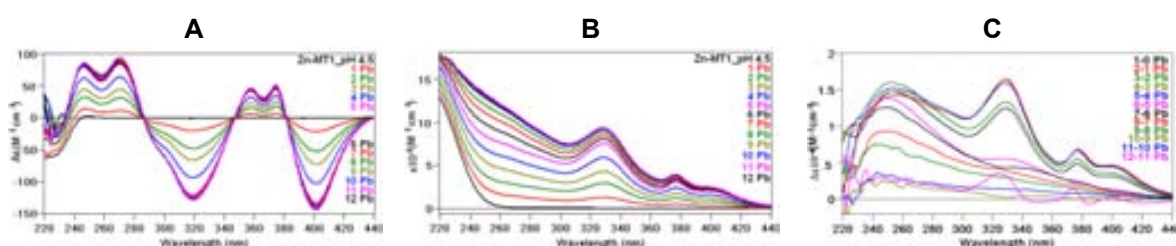


Figura 44. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ a pH 4.5 y 55 $^\circ\text{C}$ hasta 12 eq de Pb(II) añadidos máx. t_{est} .

Por su parte, la valoración de la solución 5 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ con Pb(II) provoca la aparición de nuevas absorciones en los espectros de DC y UV-vis (Fig. 45), análogas a las mostradas anteriormente para 10 y 20 μM , pero en este caso, la intensidad de las bandas formadas es menor, aún teniendo en cuenta que se representa $\Delta\epsilon$, que debería ser independiente de la concentración de la proteína. En los espectros de UV-vis se observaron las absorciones de *tipo I* sólo por la contribución del 1°, 3° y 5° eq de Pb(II), en cambio en las valoraciones de 10 y 20 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ estas señales han estado presentes desde la primera adición de Pb(II) hasta la saturación de la proteína (5 iones Pb(II)).

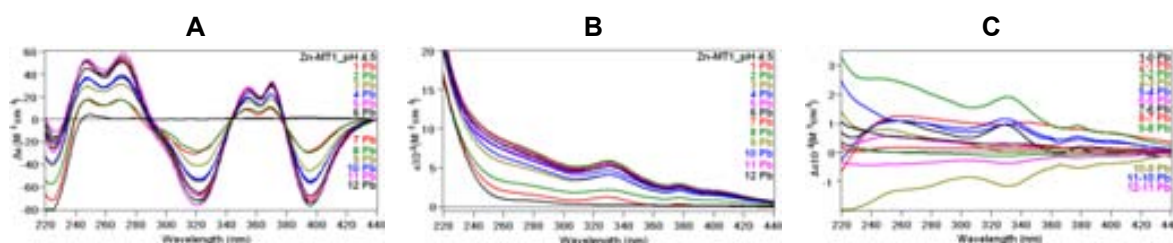


Figura 45. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 5 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ a pH 4.5 y 55 $^\circ\text{C}$ hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

De igual forma, se realizaron las valoraciones de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ a 55 $^\circ\text{C}$ a las concentraciones 20 y 5 μM , pero esta vez a pH 7.0. En la valoración a 20 μM , los espectros de DC y UV-vis (Fig. 46A-B) revelan absorciones similares a las observadas

al valorar esta proteína a 10 μ M, pH 7.0 y 55 $^{\circ}$ C, pero muestran pequeñas diferencias en la evolución por cada equivalente de plomo añadido, y además la saturación de las señales se da a partir del 7 $^{\circ}$ eq de Pb(II), mientras que a 10 μ M para el 9 $^{\circ}$ eq Pb(II). En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 46C) existen diferentes tipos de absorciones, así como en la valoración a 10 μ M, la contribución del 2 $^{\circ}$, 3 $^{\circ}$, 5 $^{\circ}$ y 7 $^{\circ}$ eq de Pb(II) muestran absorciones de *tipo I* (250, 330, 375 y 400 nm) y en cambio para el 1 $^{\circ}$, 4 $^{\circ}$ y 6 $^{\circ}$ eq de Pb(II) se observan las señales de *tipo II* (250 y 350 nm).

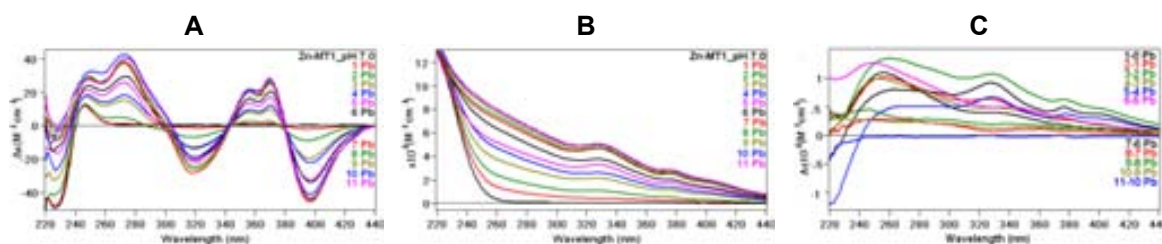


Figura 46. Espectros de (**A**) DC, (**B**) UV-vis y (**C**) dif. UV -vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μ M de Zn₇-MT1 a pH 7.0 y 55 $^{\circ}$ C hasta 11 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

En la valoración de Zn₇-MT1 de concentración 5 μ M (pH 7.0 y 55 $^{\circ}$ C), los espectros de DC y UV-vis (Fig. 47A-B) muestran absorciones similares pero menos definidas que en las otras concentraciones y la saturación de las señales se da para siete iones Pb(II). Los espectros de DC son menos isodicroicos e intensos. Y en los espectros de dif. UV-vis (Fig. 47C) se observan los dos tipos de absorciones observadas en las otras valoraciones a pH 7.0, en donde el 1 $^{\circ}$, 2 $^{\circ}$ y 6 $^{\circ}$ eq de Pb(II) presentan las de *tipo II*, en cambio las cuatro bandas típicas de *tipo I* no son tan visibles excepto para el 7 $^{\circ}$ eq de Pb(II).

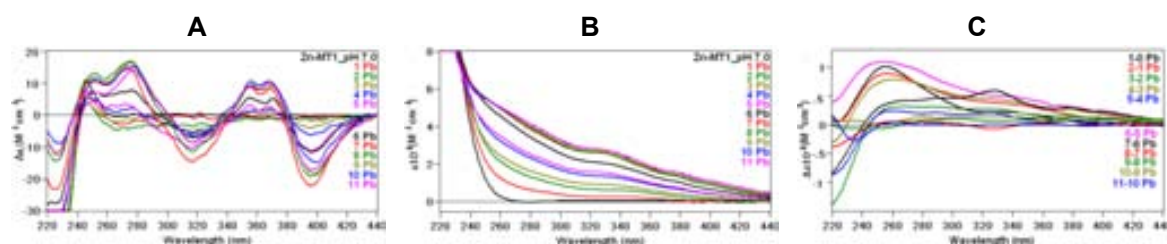


Figura 47. Espectros de (**A**) DC, (**B**) UV-vis y (**C**) dif. UV -vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 5 μ M de Zn₇-MT1 a pH 7.0 y 55 $^{\circ}$ C hasta 11 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Finalmente, el estudio de la habilidad coordinante de Zn₇-MT1 frente a Pb(II) se llevó a cabo en condiciones similares a las fisiológicas, para un mayor entendimiento de cómo podría actuar esta proteína como un agente detoxificante de Pb(II) en el organismo. Para esto, se ha realizado una valoración de la solución de proteína 10 μ M, a pH 7.0 y a 37 $^{\circ}$ C (Fig. 48), en donde se observaron que los espectros de DC y UV-vis

son muy similares a los mostrados en la valoración análoga pero a una temperatura de 55 °C, si bien las absorciones ahora registradas son menos definidas y se observan menos puntos isodicroicos, aún así en ambos experimentos las señales espectroscópicas se saturan alrededor de los nueve iones Pb(II).

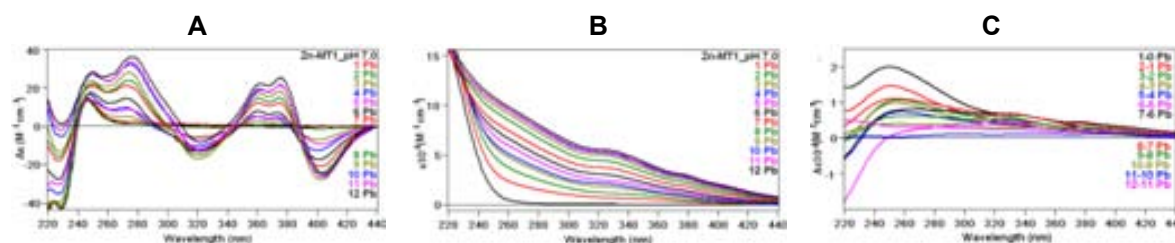


Figura 48. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 10 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ a pH 7.0 y 37 °C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 49) se observaron absorciones de *tipo II* (250 y 350 nm) por las contribuciones del 1°, 2°, 4°, 6° y 9° eq de Pb(II), y en cambio el conjunto de las cuatro absorciones, *tipo I*, sólo se observan para el 3°, 5°, 7° y 8° eq de Pb(II), de manera similar que en la valoración a 55 °C. Esta similitud, a pesar de la variación de temperatura, nos podría indicar que las especies Pb-MT1 formadas en ambas valoraciones, tienen un mismo entorno de coordinación, es decir, cromóforos semejantes.

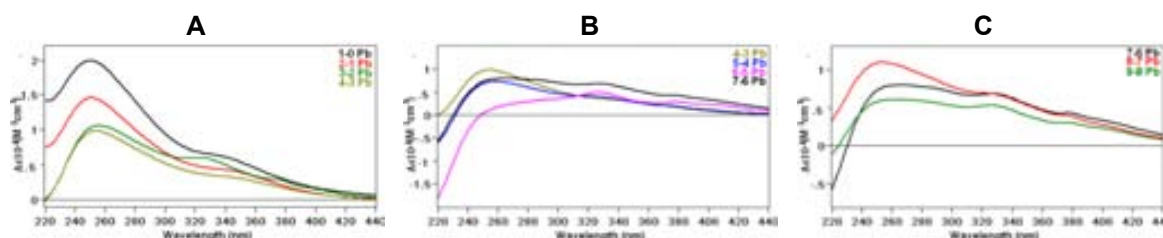


Figura 49. Espectros de dif. UV-vis del 1° hasta 9° eq de Pb(II) añadido en la valoración de una solución 10 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ a pH 7.0 y 37 °C con máx. t_{est} .

Así la globalidad de los resultados espectroscópicos reveló que hay una serie de factores que pueden afectar en mayor o menor grado la formación de las especies Pb-MT1, pero aún así en todos los experimentos se observa una similitud en el conjunto de las absorciones características de los complejos Pb-MT1, siendo para el DC: 225(-), 246-271(+), 318(-), 358-375(+), 400(-) nm (para ambos pHs) y las absorciones características correspondientes al enlace Pb-MT1, a pH 4.5 sólo las de *tipo I*: 250, 330, 375 y 400 nm; y a pH 7.0 se le suman las de *tipo II*: 250 y 350 nm, que revelan la formación de una especie Pb-SCys₃ de geometría piramidal trigonal. Todas estas

absorciones presentan algunas variaciones tanto en intensidad como en la definición, así también en la evolución y saturación de las señales.

2.1.1.2. Estudio por espectroscopía de masas, ESI-MS

En este apartado se presenta el análisis y comparación de los resultados obtenidos de la interacción de Pb(II) con Zn₇-MT1 por espectrometría de masas (ESI-MS). Tal como se describió en la parte experimental, esta técnica nos permite obtener información sobre las especies que se forman al enlazarse el ión Pb(II) a la proteína, así como la evolución y estabilidad de las especies de Pb-MT1 respecto al tiempo.

Los experimentos realizados mediante ESI-MS se llevaron a cabo siguiendo dos metodologías: añadiendo la misma cantidad de Pb(II) que el contenido de Zn(II) inicial; es decir, 7° eq de Pb(II); y añadiendo un gran exceso de plomo, 35 equivalentes de Pb(II), a las correspondientes soluciones 10 μ M de Zn₇-MT1 a 25 °C y pH 7.0. Estas muestras fueron analizadas a lo largo de 24 horas con el fin de observar la evolución de las especies formadas.

El análisis de los resultados obtenidos en estas condiciones muestra que, la adición de siete iones Pb(II) a la solución proteica da lugar a la formación de especies de Pb(II), tanto homometálicas como heterometálicas Pb,Zn-MT1, como se puede observar en la Fig. 50, donde además se puede apreciar que en un primer momento (10 min) tras la adición de Pb(II), el pico más intenso corresponde a la especie de partida Zn₇-MT1 y aparecen otros picos de menor intensidad identificados como especies mixtas de Pb,Zn-MT1.

A partir de 1 hora, la intensidad relativa de los picos de las especies de Pb-MT1 aumenta considerablemente, siendo Pb₉-MT1 la especie mayoritaria, junto a Pb₈Zn₁-MT1, que coexisten con especies de menor intensidad (Pb₁₀⁻, Pb₄Zn₄⁻ y Pb₇Zn₁-MT1, entre otras). A medida que avanza el tiempo de reacción hasta las 6 horas, la especie inicial de Zn₇-MT1 va disminuyendo en intensidad hasta desaparecer, y a su vez van aumentando las especies Pb₉⁻ y Pb₄Zn₄-MT1. Tras 24 horas se observa que la cantidad de Zn(II) unido a MT1 es cada vez menor, mostrando las siguientes especies de Pb(II) en solución, Pb₉⁻, Pb₁₀⁻, Pb₈⁻, Pb₈Zn₁⁻ y Pb₇Zn₁-MT1, por orden de intensidad.

El hecho de que hay una formación de una gran variedad de especies tiene relación con lo observado anteriormente por DC y UV-vis, en donde no hay un proceso cooperativo en la formación de las especies Pb-MT1. También se puede observar en los espectros de masas registrados la formación de una especie intermedia muy importante, Pb₄Zn₄-MT1, que a medida que pasa el tiempo va disminuyendo su abundancia.

Cabe mencionar que las especies Pb-MT1 formadas, ya sean homó o heterometálicas, suman un total de 8 y 9 iones, y se observa como excepción la especie Pb₁₀-MT1, una de las más abundantes a las 24 h, así como otras excepciones de especies minoritarias a lo largo de la reacción como son Pb₁Zn₅⁻, Pb₂Zn₄⁻, Pb₂Zn₅-MT1.

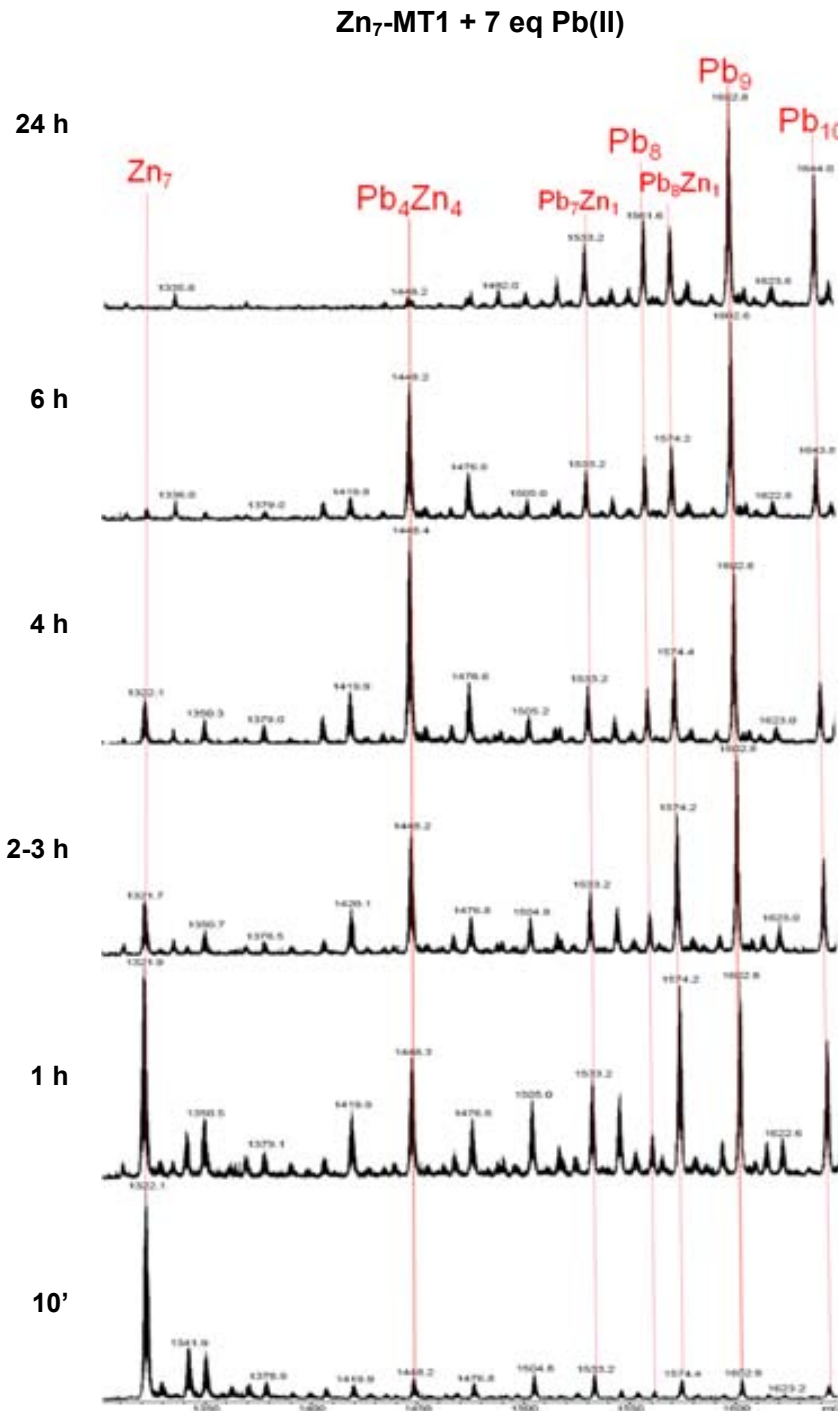


Figura 50. Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la evolución de una solución de Zn₇-MT1 10 μM, a pH 7.0 y 25 °C, tras la adición de 7 eq de Pb(II). Los espectros muestran estado de carga +5, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

A diferencia de lo observado anteriormente, los espectros de masas registrados de Zn₇-MT1 en presencia de un exceso de iones Pb(II) (Fig. 51), muestran que la especie inicial (Zn₇-MT1) desaparece y sólo se observa la formación de especies homometálicas de Pb(II), como Pb₉⁻, Pb₁₀⁻, Pb₈⁻ y Pb₇-MT1, siendo la mayoritaria inicialmente Pb₉-MT1 y a partir de las 6 horas, la especie Pb₁₀-MT1 es la más abundante hasta las 24 horas.

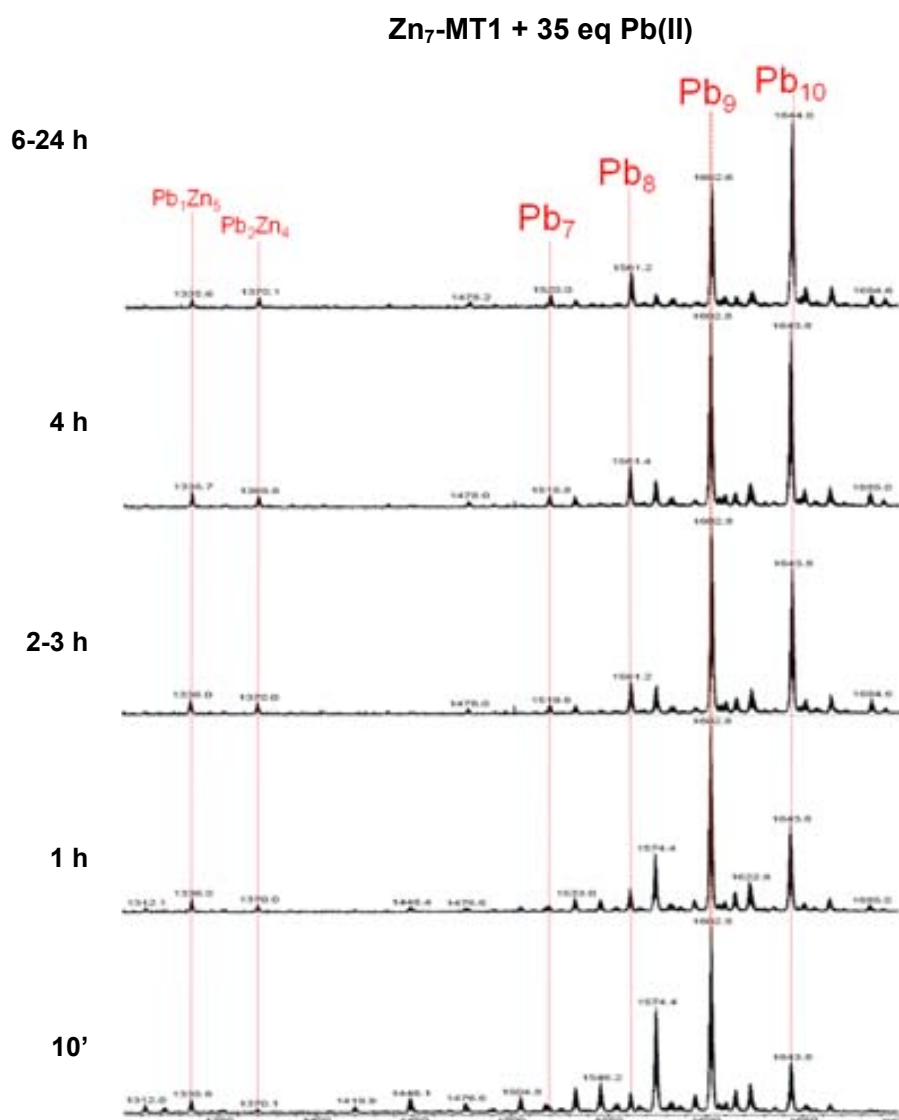


Figura 51. Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la evolución de una solución de Zn₇-MT1 10 μ M, a pH 7.0 y 25 °C, tras la adición de 35 eq de Pb(II). Los espectros muestran estado de carga +5, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

En ambos experimentos los espectros de masas registrados muestran la formación de las especies Pb₉⁻ y Pb₁₀⁻-MT1, siendo éstos los más abundantes indiferentes de la cantidad de iones Pb(II) que se añadieran, y esto coincide con la saturación de las señales espectroscópicas de DC y UV-vis observadas a pH 7.0, que se da a partir del 9^o eq de Pb(II) añadido.

También se realizó un experimento de una solución 10 μM de Zn-MT1 que se llevó a cabo en condiciones fisiológicas, a pH 7.0 y 37 $^{\circ}\text{C}$, en donde se añadieron 10 eq de Pb(II) suficientes para la saturación de la proteína y se registraron hasta las 8 h (Fig. 52).

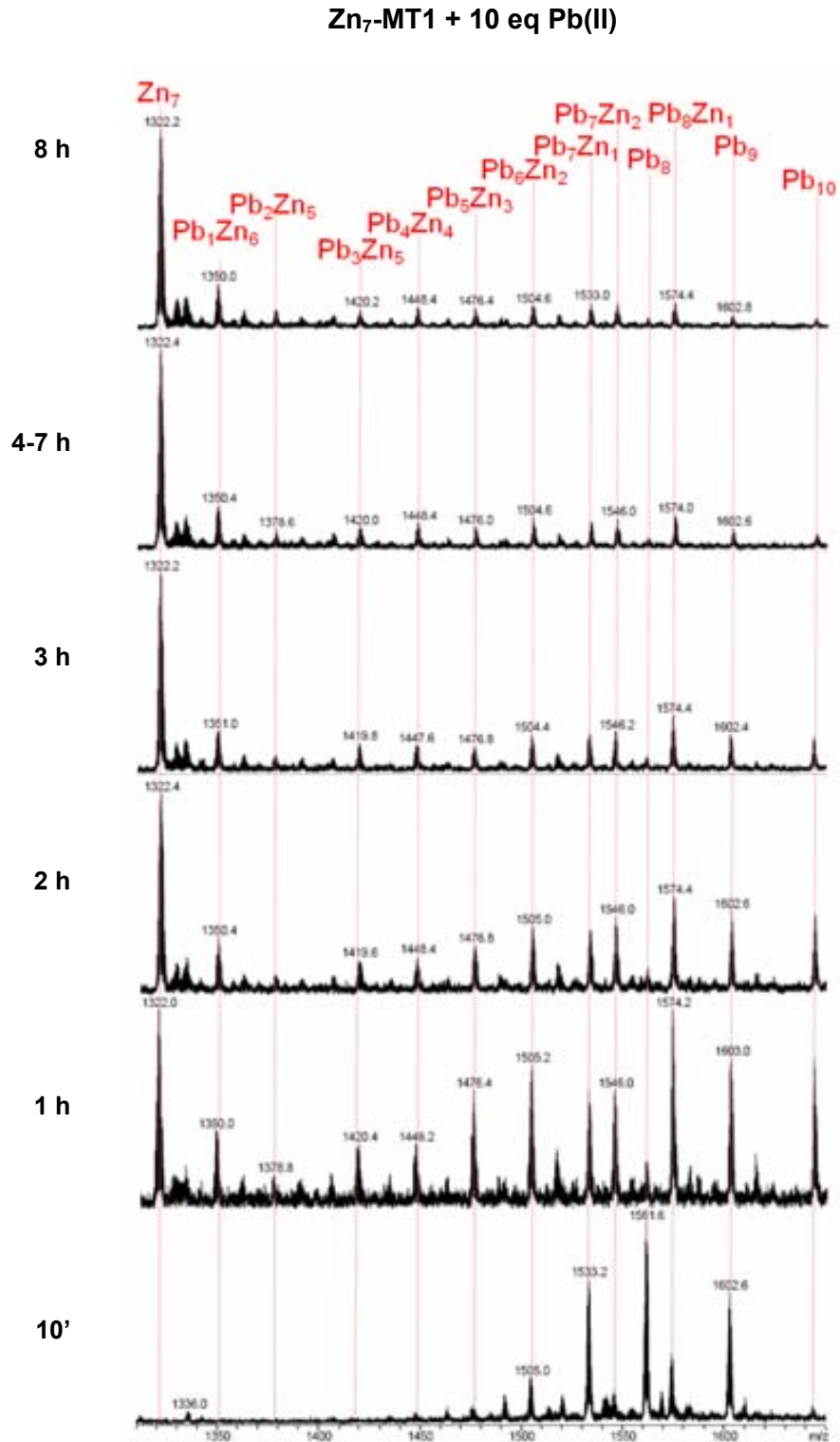


Figura 52. Espectros de ESI-MS registrados durante 8 horas que muestran la evolución de una solución de Zn₇-MT1 10 μM , a pH 7.0 y 37 $^{\circ}\text{C}$, tras la adición de 10 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +5, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

Los espectros de masas registrados (Fig. 52) revelan que a tiempo inicial, la especie de partida Zn₇-MT1 desaparece y sólo se forman las siguientes especies: Pb₈-MT1 mayoritaria, seguida por Pb₇Zn₁- y Pb₉-MT1, y menos abundantes Pb₈Zn₁- y Pb₆Zn₂-MT1. Pero a partir de 1 hora la especie Zn₇-MT1 pasa a ser la más abundante, mientras que una gran variedad de especies que contienen Pb(II), tanto homó- como heterometálicas Pb_yZn_x-MT1, disminuyen drásticamente su intensidad a lo largo del tiempo hasta prácticamente desaparecer.

Cabe destacar que la mayoría de las especies formadas de Pb(II), sean mixtas como homometálicas, contienen entre 8 y 9 iones metálicos (excepto Pb₁Zn₆-, Pb₂Zn₅- y Pb₁₀-MT1), tal y como se observó en los experimentos anteriormente descritos. Así, el conjunto de datos parece indicar que en estas condiciones, se forman inicialmente un conjunto de especies Pb_yZn_x-MT1 (x+y= 8 ó 9) que no son estables en el tiempo, que dan lugar a la especie inicial Zn₇-MT1 al cabo de tan sólo 2 horas.

2.1.1.3. Estudio por microcalorimetría, ITC

Con el fin de obtener datos termodinámicos referentes al desplazamiento de los iones Zn (II) por Pb(II) al valorar la proteína Zn₇-MT1, se realizaron dos tipos de experimentos mediante ITC (Tabla 4): uno en las condiciones estándar de trabajo definidas para el estudio espectroscópico, es decir, una solución 10 μ M de proteína, pH 4.5 y a una temperatura de 55 °C; y el otro estudio se ejecutó de manera similar pero sólo variando la concentración de proteína, a 5 μ M, para así obtener información sobre el posible efecto de la concentración en la formación de las especies Pb-MT1.

A continuación en la Fig. 53 se muestran las curvas obtenidas de las valoraciones Zn-MT1 con iones Pb(II) y los correspondientes valores sobre el proceso termodinámico de la sustitución del ión Zn(II) por Pb(II) se encuentran recogidos en la Tabla 12.

En la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT1 (Fig. 53A), la sustitución de los iones Zn(II) por Pb(II) se llevó a cabo en un proceso termodinámicamente favorecido con un Δ G de -8930 cal/mol, en donde la diferencia de entropía (Δ S) de 10.3 cal/molK indica que la formación de los nuevos clústeres de Pb(II) formados presentan un mayor desorden molecular que los de Zn(II).

MT1	K x10 ⁻⁵	Δ G (cal/mol)	Δ H (cal/mol)	Δ S (cal/molK)	N (Eq de Pb(II))
10 μ M	9.0 \pm 0.78	-8930	-5545 \pm 43	10.3	8.5 \pm 0.04
5 μ M	2.2 \pm 0.68	-9513	-5105 \pm 134	13.4	8.2 \pm 0.13

Tabla 12. Datos termodinámicos obtenidos a partir de los experimentos de ITC de las valoraciones de las soluciones de 10 y 5 μ M de Zn₇-MT1, ambas a pH 4.5 y 55 °C, con Pb(II). El resultado de Δ G se ha obtenido a partir de la fórmula Δ G = -RT lnK.

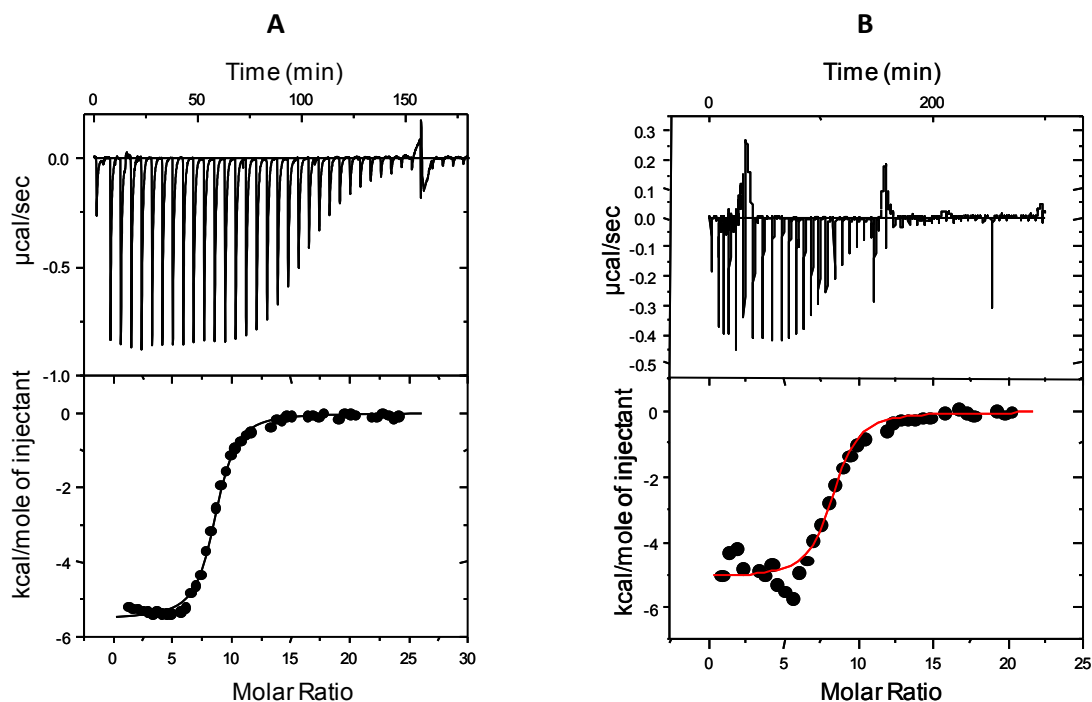


Figura 53. Termogramas (arriba) y representación del calor desprendido (abajo) frente a los equivalentes de Pb(II) añadidos a una solución (A) 10 μM y (B) 5 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ a pH 4.5 y 55 $^\circ\text{C}$, de acuerdo con la metodología descrita en los apartados III y VI-2.

Así también, la diferencia de entalpía (ΔH) de -5545 cal/mol revela un proceso energéticamente favorable, siendo una reacción exotérmica. El número de sitios de coordinación (N) corresponden a 8.50 ± 0.04 iones Pb(II) que se puede aproximar a 9, que a su vez coinciden con el punto de saturación observado en los experimentos espectroscópicos de DC y UV-vis en condiciones de pH 7.0, y también es similar a la formación de la especie $\text{Pb}_9\text{-MT1}$ observada por ESI-MS. La curva teórica no coincide totalmente con la experimental al comienzo de la valoración, por lo que podría indicar que hay más de un sitio de coordinación y éstos no son idénticos.

Por otra parte, en la valoración con Pb(II) de una solución 5 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ (Fig. 53B) el proceso es favorecido termodinámicamente, con un ΔG igual a -9513 cal/mol, así también el proceso entrópico como entálpico son favorables (ΔS de 13.4 cal/molK y ΔH de -5105 cal/mol). El número de iones Pb(II) coordinados es aproximadamente 8 ($N=8.2 \pm 0.13$), y se observó que la curva teórica no coincide con la experimental, mostrando en las primeras adiciones un desorden de puntos.

Los resultados obtenidos a partir de ambos experimentos muestran un comportamiento similar frente a Pb(II), indicando que MT1 enlaza aproximadamente entre 8 y 9 iones Pb(II) en sitios de coordinación no idénticos, en donde la concentración no muestra un mayor efecto, pero sí al comparar las constantes de afinidad (K), en donde para 10 μM esta es menor que para 5 μM , por lo que podemos decir que hay una menor afinidad frente a Pb(II) cuando la proteína está más

concentrada. A su vez la entropía es levemente mayor para 5 μ M, revelando que los clústeres formados a menor concentración son más desordenados que cuando la proteína está más concentrada, mientras que la entalpía es levemente menor, por lo que la reacción es menos exotérmica que a 10 μ M.

Al comparar estas dos valoraciones se observó que la mayor diferencia que presentan es precisamente en las curvas experimentales y termogramas (Fig. 53), mostrando para 10 μ M sólo una leve diferencia con la teórica, en cambio para 5 μ M hay un mayor desigualdad de puntos al comienzo de la curva de la valoración, esto podría indicar que hay una evolución distinta entre ellas.

Ambas valoraciones revelan que existe más de un sitio de coordinación de Pb(II), observándose en las dos curvas un punto importante cercano al 5° eq de Pb(II), análogo al punto de saturación observado en los espectros de DC y UV-vis a pH 4.5, además se observó en los espectros de dif. UV-vis que estos sitios presentan las mismas absorciones (*tipo I*, las cuatro bandas características), que podría indicar que tienen un sitio de unión de Pb(II) idéntico en MT1.

De manera similar el punto de saturación de Zn₇-MT1 tuvo lugar para 9 eq de Pb(II) añadidos en condiciones de pH 7.0, observado anteriormente por espectroscopía de DC y UV-vis, y en los espectros de dif. UV-vis aparecen más de un tipo de absorciones que revelan más de un entorno de coordinación de los iones Pb(II) en MT1. A pesar de que la condición experimental de pH es diferente, la relación del N° de eq de Pb(II) puede ser debido a un menor t_{est} de estos iones en los experimentos de ITC y esto podría ser comparable a la valoración a pH 7.0, en donde los iones plomo les cuesta más entrar y estabilizarse en la proteína.

2.1.2. Dominio α MT1

2.1.2.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis

El presente estudio de la habilidad coordinante de Zn₄- α MT1 frente a Pb(II), se ha llevado a cabo mediante las valoraciones realizadas en diferentes condiciones experimentales registradas por espectroscopía de DC y UV-vis, recogidas en la Tabla 13.

Concentración (μ M)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	pH	
20	25	4.5	7.0
	37	7.0	

Tabla 13. Condiciones experimentales de las valoraciones de Zn₄- α MT1 con Pb(II) para el estudio espectroscópico de DC y UV-vis.

Así como se puede observar en esta tabla, la condición estándar de trabajo es una solución 20 μM de proteína, a pH 4.5 y 25 $^{\circ}\text{C}$, que será el primer análisis. Luego se comparará con los resultados al variar el pH a 7.0 y por último, se analizarán las condiciones similares a las fisiológicas (37 $^{\circ}\text{C}$ y pH 7.0).

El análisis de los datos espectroscópicos de la valoración de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT1}$ con Pb(II) en condiciones estándar revela la coordinación de este ión a este fragmento, mostrando la aparición de nuevas absorciones muy diferentes a la inicial (Fig. 54, Tabla 14), que indican un mayor plegamiento de este dominio frente a Pb(II) y a su vez estas señales no son semejantes a las observadas para Pb-MT1 , que evidencia una estructuración diferente frente a este metal.

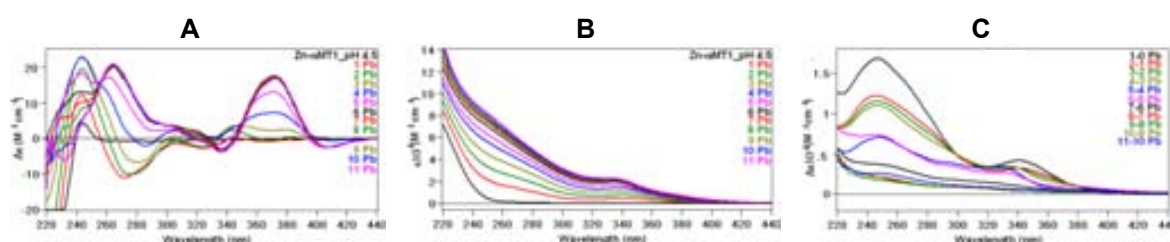


Figura 54. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT1}$ a pH 4.5 y 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 11 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Eq de Pb(II)	DC	UV-vis	dif. UV-vis
1 $^{\circ}$ -2 $^{\circ}$	244(+), 270(-), 306(-), 328(-), 350(+) nm	250, 340 nm	250, 350 nm
3 $^{\circ}$ -5 $^{\circ}$	244(+), 263(+), 306(+), 370(+) nm		(5 $^{\circ}$) 250, 300, 330 nm
6 $^{\circ}$	265(+), 306(+), 337(-), 370(+), 405(-) nm		

Tabla 14. Absorciones correspondientes a los espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis de la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT1}$ a pH 4.5 y 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 11 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

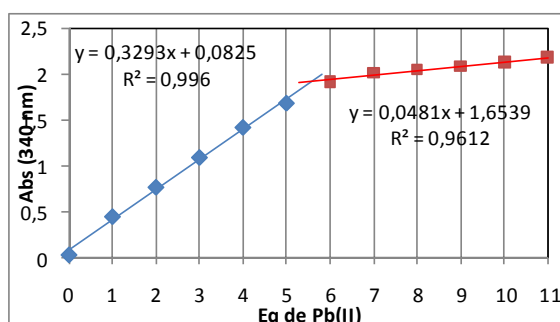
La saturación de las señales espectroscópicas, tanto para el DC como el UV-vis, se observan a partir del 6 $^{\circ}$ eq de Pb(II) añadido a este dominio.

En los espectros de DC (Fig. 54A) se observa que la valoración transcurre en dos etapas. La primera comprende la adición de los cuatro primeros equivalentes de Pb(II) , en donde aumenta la absorción inicial de 244 nm hasta el 4 $^{\circ}$ eq de Pb(II) y además aparecen absorciones a 270(-) nm que se va desplazando a medida que aumentan los iones Pb(II) en solución, otra banda a 306(+) nm va aumentando, y hay un desplazamiento de las señales. La segunda etapa se da a partir del 5 $^{\circ}$ eq de Pb(II) en donde se observa que la absorción a 244(+) disminuye y aparece una a 263(+) nm y se forman nuevas bandas a 270(+), 337(-) y una 370(+) nm que son diferentes a las observadas anteriormente y con un proceso que tiene cuatro puntos isodicroicos a 255,

326, 350 y 390 nm desde la adición 4° eq de Pb(II) hasta la saturación de las señales de DC.

En los espectros de UV-vis (Fig. 54B) se observan dos absorciones a 250 y 340 nm, similares a las descritas para el clúster Pb-SCys₃ encontrado en las proteínas de zinc con una geometría piramidal trigonal. Estas señales van aumentando en intensidad a medida que se adicionan los iones Pb(II) hasta saturarse, así como se puede ver en las gráficas de absorbancia a 340 nm vs. equivalentes de Pb(II) añadidos que muestran puntos de equivalencia entre 5 y 6 iones Pb(II) (Fig. 55).

Figura 55. Gráfica de absorbancia vs. eq de Pb(II) a 340 nm de la valoración de Zn₄- α MT1 a 20 μ M a pH 4.5 y 25 °C hasta 11 eq Pb(II) añadidos, concediendo máx. t_{est}.



En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 54C) se observa que hay más de un tipo de absorciones que varían respecto a los equivalentes de Pb(II) añadidos. El primer equivalente genera el mayor aporte en intensidad de las absorciones *tipo II* (Fig. 56A), luego para el 3° y 4° eq se van desplazando (Fig. 56B) y aparece otro grupo de bandas para el 5° y 6° eq (Fig. 56C), y por último a partir del 7° eq ya no se observan absorciones intensas y definidas, reflejando la saturación de la proteína. Esto corrobora que este proceso de formación de las especies Pb- α MT1 no es cooperativo, y por tanto, hay especies intermedias.

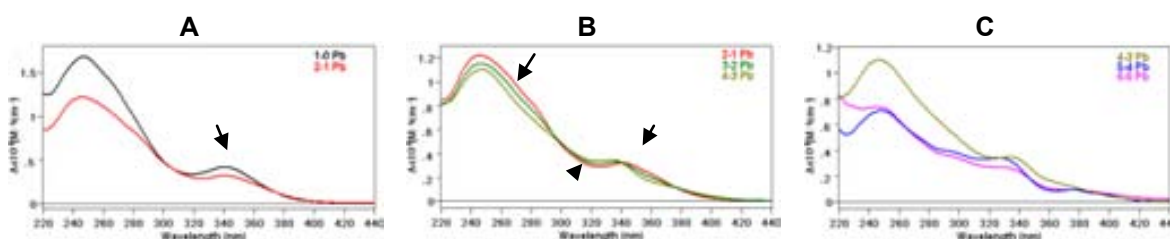


Figura 56. Espectros de dif. UV-vis del (A) 1° y 2°; (B) 2°, 3° y 4°; y (C) 4°, 5° y 6° eq de Pb(II) añadido en la valoración de Zn₄- α MT1 a 20 μ M a pH 4.5 y 25 °C.

En la valoración de Zn- α MT1 a pH 7.0, tras la adición de los primeros iones Pb(II) tanto a 25 como a 37 °C, se observan nuevas absorciones manteniéndose el espectro inicial (Fig. 57), indicando así que el ión Pb(II) no se coordina a la proteína, al contrario que a pH 4.5.

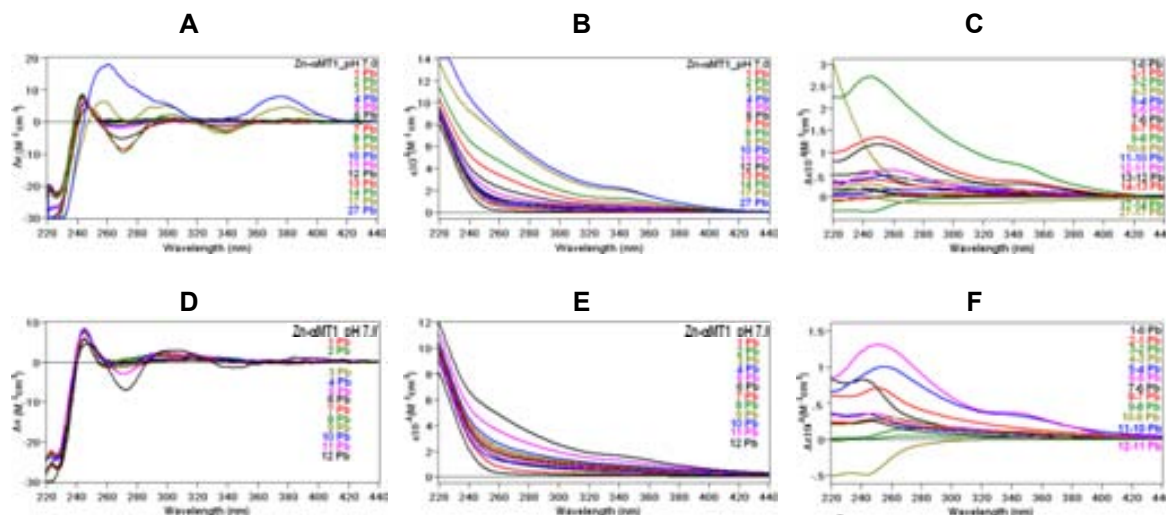


Figura 57. Espectros de (A y D) DC, (B y E) UV-vis y (C y F) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución $20 \mu\text{M}$ de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT1}$ a pH 7.0, a 25 y 37 °C hasta 27 y 12 eq de Pb(II) añadidos, respectivamente, con máx. t_{est} .

No obstante, se ha podido observar (Fig. 57) que a partir del 7° eq de Pb(II) hay un leve cambio en la absorción a 240 (+) nm correspondiente al enlace Zn-SCys , y a medida que aumenta la cantidad de Pb(II) en solución esta señal va disminuyendo y desplazándose a mayor longitud de onda. Además aparecen nuevas absorciones a 271(-) y una leve absorción a 302(+) nm. Al añadir un exceso de aproximadamente 12° eq de Pb(II) (Fig. 57A) se observó la aparición de cinco nuevas señales en el DC: a 260(+), 271 (-), 302 (+), 340(-) y 380(+) nm, que muestran un espectro de diacrisma similar al observado para el 1° eq de Pb(II) añadido a $\text{Zn-}\alpha\text{MT1}$ a pH 4.5 (Fig. 58).

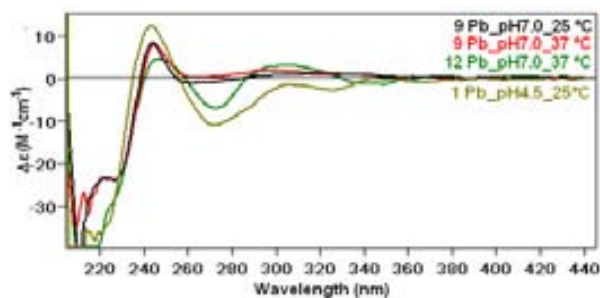


Figura 58. Espectros de DC de las adiciones del 9° eq de Pb(II) a 25 y 37 °C, del 12° eq de Pb(II) a 37 °C, en las valoraciones de una solución $20 \mu\text{M}$ de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT1}$ a pH 7.0, comparados con el 1° eq de Pb(II) añadido a pH 4.5.

Por su parte, en los espectros de UV-vis (Fig. 57B) se observan dos absorciones a 260 y 350 nm semejantes a las observadas a pH 4.5. Finalmente, con un exceso de 17 y luego 27 iones Pb(II) , se observa una variación de las señales de DC, y en los espectros de UV-vis las dos bandas observadas son más intensas. Los datos espectroscópicos (DC y UV-vis) evidencian la coordinación del ión Pb(II) en el

fragmento Zn- α MT1 y la posible sustitución de los iones Zn(II) inicialmente enlazados, pero este proceso no es favorable como a pH ácido.

Así el conjunto de resultados obtenidos por DC y UV-vis, indican que la adición de los iones Pb(II) al dominio Zn- α MT1 a pH 4.5, éstos se coordinan a la proteína y muestran la saturación espectral para Pb₆- α MT1. En cambio, cuando el fragmento está a pH 7.0, sólo se evidencia una interacción con un exceso de Pb(II), observándose un proceso de metalación lento, y esto es contradictorio si se tiene en cuenta la escala de afinidad de los tiolatos metálicos, en donde el ión Pb(II) tiene una mayor afinidad que el Zn(II) por los sitios de coordinación de la MT. Esto podría apoyar la idea de que el fragmento α MT1 por tener un carácter más cercano a una Zn-tioneína, prefiere seguir coordinando el Zn(II) con el cual se estructura de manera más estable y sólo frente a un exceso de Pb(II) en el medio se favorece su coordinación.

2.1.2.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS

Los experimentos realizados mediante ESI-MS se llevaron a cabo siguiendo dos metodologías: añadiendo la misma cantidad de Pb(II) que el contenido de Zn(II) inicial; y añadiendo un gran exceso de Pb(II). En un primer estudio se llevó a cabo la adición de 4 equivalentes de Pb(II) a una solución 20 μ M de Zn₄- α MT1 a 25 °C y pH 7.0. En otro experimento similar, se añadieron 16 iones Pb(II) a la misma proteína bajo las mismas condiciones experimentales. Estas muestras fueron analizadas a lo largo de 12 horas con el fin de observar la evolución de las especies formadas.

El análisis de los resultados obtenidos en estas condiciones muestra que, la adición de cuatro equivalentes de Pb(II) a la solución proteica da lugar a la formación de especies, tanto homometálicas de Pb- α MT1 como heterometálicas Pb,Zn- α MT1, como se puede observar en la Fig. 59. En un primer momento se observó la formación de especies homo- y heterometálicas de Pb(II) y Zn(II) de menor abundancia, siendo el clúster inicial Zn₄- α MT1 el más abundante. Otras especies formadas de menor abundancia son: Pb₁Zn₃⁻, Pb₅⁻, seguidas de Pb₃Zn₁⁻, Pb₃Zn₂⁻, Pb₄⁻ y Pb₄Zn₁- α MT1 que se mantienen presentes durante el resto del tiempo (12 horas), pero pierden intensidad a medida que transcurre el tiempo hasta casi desaparecer.

En el segundo experimento, los espectros de masas registrados (Fig. 60) tras la adición de un exceso de 16 eq de Pb(II) a la proteína Zn₄- α MT1, muestran la formación de especies tanto homo- y heterometálicas Pb,Zn- α MT1. El clúster más abundante es Zn₄- α MT1 que se mantiene estable en el tiempo, y las especies de plomo(II) más importantes son Pb₁Zn₃⁻ y Pb₅- α MT1. También se forman otros clústeres de menor

abundancia como son: $\text{Pb}_6\text{-}\alpha\text{MT1}$, Pb_3Zn_2^- , Pb_4^- , $\text{Pb}_4\text{Zn}_1\text{-}\alpha\text{MT1}$, cuyos picos pierden intensidad a medida que transcurre el tiempo hasta desaparecer.

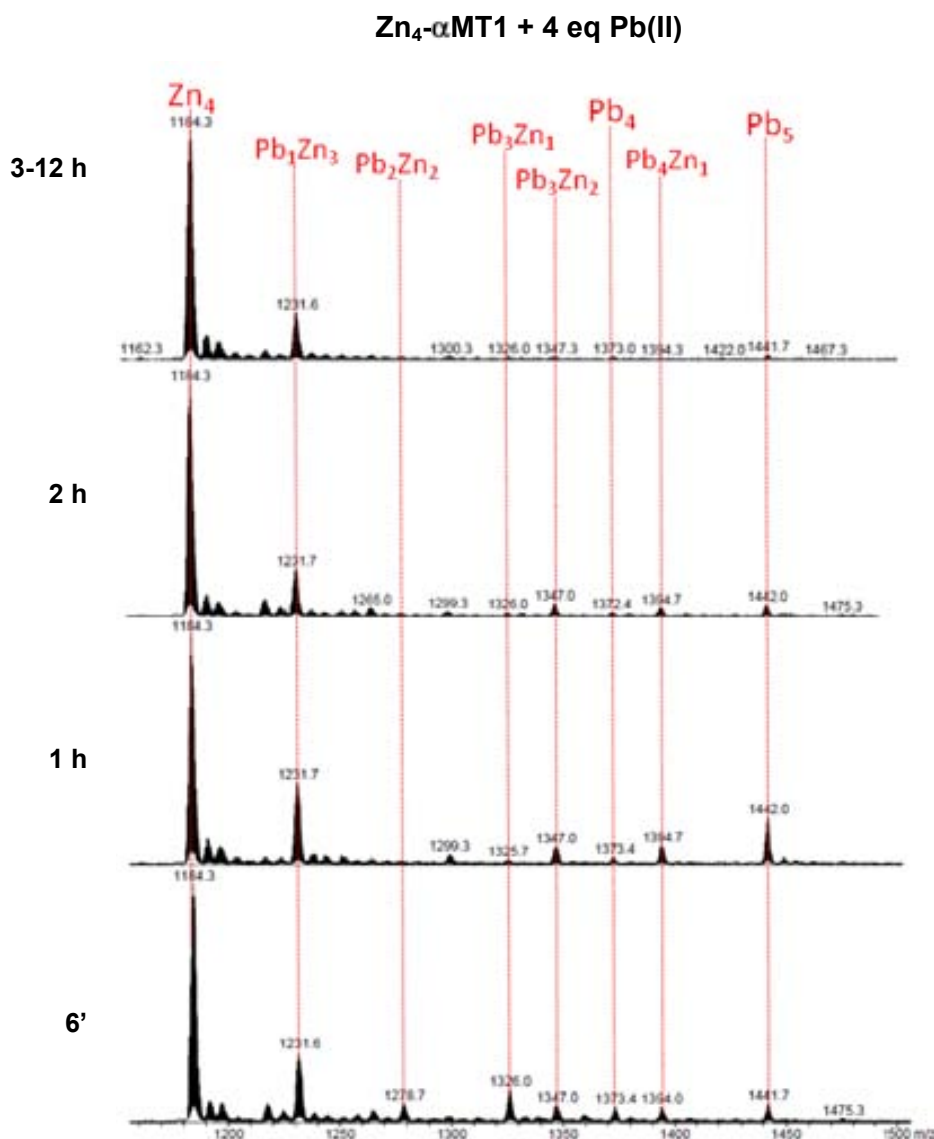


Figura 59. Espectros de ESI-MS registrados durante 12 horas que muestran la evolución de una solución de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT1}$ 20 μM , a pH 7.0 y 25 °C, tras la adición de 4 eq de Pb(II) . Los espectros muestran el estado de carga +3, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

En ambos experimentos de ESI-MS (Fig. 59 y 60), tanto al añadir 4 como 16 iones Pb(II) a $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT1}$, los resultados obtenidos muestran que la especie de mayor abundancia es el clúster inicial $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT1}$ y las especies de Pb(II) formadas son de menor abundancia, corroborando lo observado por DC y UV-vis a pH 7.0, revelando que este fragmento es una clara Zn-tioneína y prefiere mantenerse estructurada con iones Zn(II) .

La formación de especies homo y heterometálicas de $\text{Pb,Zn-}\alpha\text{MT1}$ con un contenido entre 5 y 6 iones, como son: Pb_3Zn_2^- , Pb_4Zn_1^- , Pb_5^- y $\text{Pb}_6\text{-}\alpha\text{MT1}$, muestran un aumento

del número de iones coordinados en comparación con los 4 iones Zn(II) iniciales, que podría indicar que los sitios de unión del ión Pb(II) son diferentes a los del ión Zn(II) en la proteína.

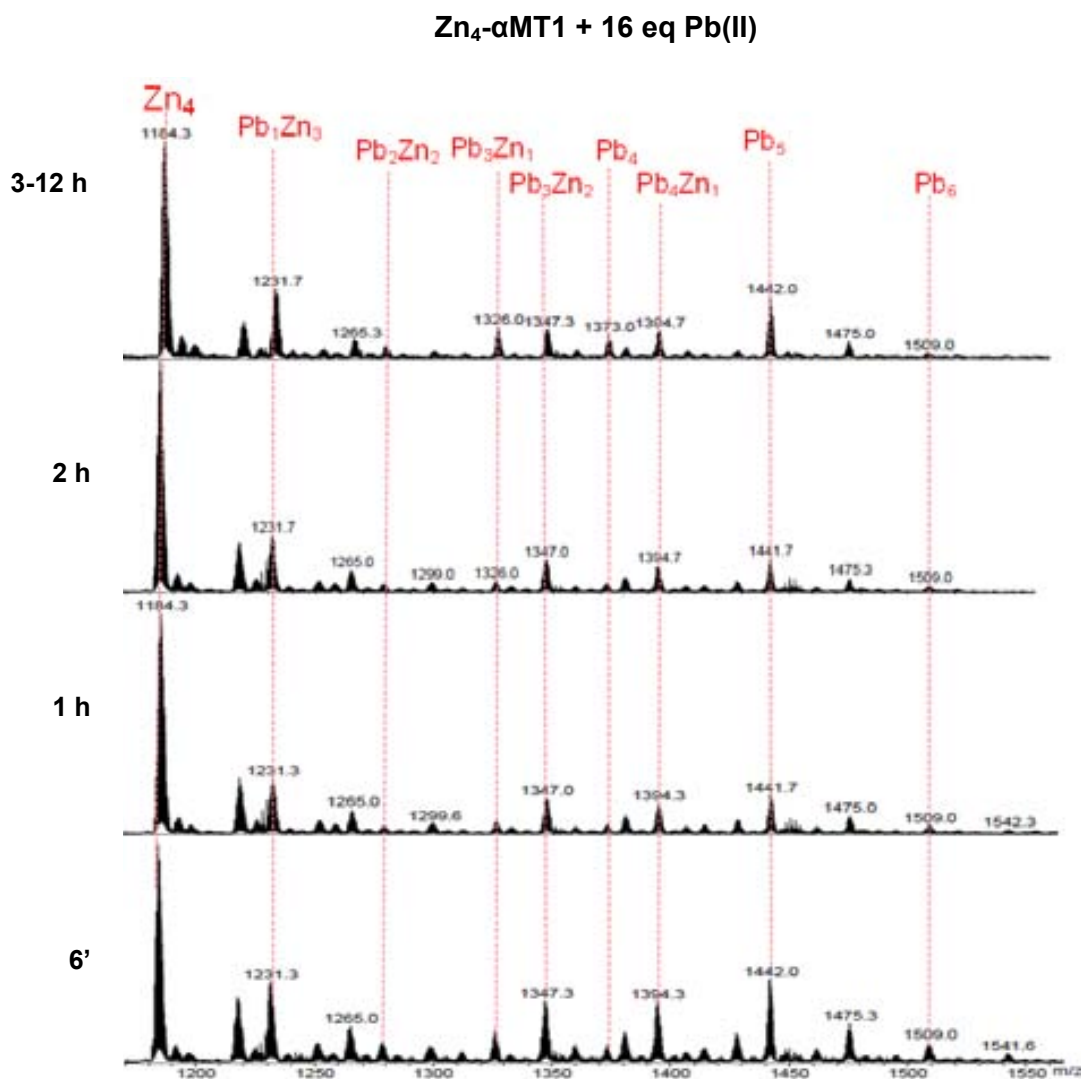


Figura 60. Espectros de ESI-MS registrados durante 12 horas que muestran la evolución de una solución de Zn₄- α MT1 20 μ M, a pH 7.0 y 25 °C, tras la adición de 16 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +3, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

Además, se observó que Zn₄- α MT1 en presencia de exceso de plomo formó hasta la especie Pb₆- α MT1, que como se observó en los espectros de DC y UV-vis (Fig. 54) es el punto de saturación en la valoración con Pb(II) de Zn₄- α MT1 a pH 4.5. Aún así, a pesar que el exceso de Pb(II) genera nuevas absorciones observadas en los espectros de DC y UV-vis, indicando una incorporación de este metal a la proteína, las especies Pb-MT que se forman no son estables, tal y como se puede observar mediante el experimento realizado por ESI-MS.

2.1.2.3. Estudio por microcalorimetría, ITC

Mediante la técnica de ITC se realiza la valoración con Pb(II) de Zn₄- α MT1, para esto se prepara un experimento en las condiciones estándar de trabajo definidas para el estudio espectroscópico, es decir, una concentración 20 μ M de este dominio, a pH 4.5 y 25 °C y se le añade consecutivamente iones Pb(II) hasta completar la saturación de la proteína.

Los valores termodinámicos del proceso de intercambio de los iones Zn(II) por Pb(II) se presentan en la Tabla 15, mientras que la representación gráfica de esta valoración en la Fig. 61.

$K \times 10^{-5}$	ΔG (cal/mol)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/molK)	N (Eq de Pb(II))
5.09 ± 0.786	-7776	-6083 ± 88	5.76	6.38 ± 0.07

Tabla 15. Datos termodinámicos obtenidos a partir del experimento de ITC de la valoración con Pb(II) de una solución 20 μ M de Zn₄- α MT1, a pH 4.5 y 25 °C. El resultado de ΔG se ha obtenido a partir de la fórmula $\Delta G = -RT \ln K$.

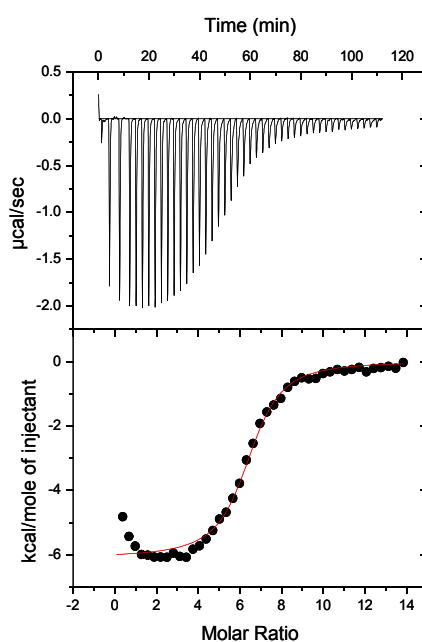


Figura 61. Termograma (arriba) y representación del calor desprendido (abajo) frente a los eq de Pb(II) añadidos a una solución 20 μ M de Zn₄- α MT1 con Pb(II) a pH 4.5 y 25 °C, de acuerdo con la metodología descrita en los apartados III y VI-2.

El análisis de los datos obtenidos de esta valoración, indican que el proceso de sustitución de los iones Zn(II) por Pb(II) es espontáneo mostrando un ΔG de -7776 cal/mol, y también termodinámicamente favorable, tanto entrópico como entálpico. La diferencia de entropía (ΔS) revela que los nuevos complejos Pb- α MT1 formados presentan un mayor desorden molecular que los iniciales clústeres Zn₄- α MT1. Y por su parte, el ΔH muestra que la reacción es exotérmica, o sea, energéticamente favorablemente. Se obtiene un número de equivalencia (N) aproximadamente de 6

iones Pb(II), similar a lo observado por espectroscopía de DC y UV-vis en las mismas condiciones. Por otra parte, se pudo observar que la curva experimental y la teórica (Fig. 61) no coinciden, revelando que hay más de un sitio de coordinación para estos 6 iones Pb(II), corroborando así la presencia de más de un tipo de absorción dependiendo de la contribución por equivalentes de Pb(II) añadidos, observado anteriormente en los espectros de dif. UV-vis.

2.1.3. Dominio β MT1

2.1.3.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis

El presente estudio de la habilidad coordinante de Zn₃- β MT1 frente a Pb(II), se ha llevado a cabo mediante las valoraciones con Pb(II) en diferentes condiciones experimentales (Tabla 16) registradas por espectroscopía de DC y UV-vis.

Concentración (μ M)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	pH	
20	25	4.5	
	37	7.0	
	55	4.5	7.0

Tabla 16. Condiciones experimentales de las valoraciones de Zn₃- β MT1 con Pb(II) para el estudio espectroscópico de DC y UV-vis.

Tal como se puede observar en la tabla anterior, las condiciones estándar de trabajo son: una solución 20 μ M de proteína, a pH 4.5 y 25 $^{\circ}$ C, que se analizará en primer lugar. A partir de estos resultados se ha observado una falta de t_{est} por eq de Pb(II), por lo que se aumenta la temperatura a 55 $^{\circ}$ C y se analizan los resultados a pH 4.5 y luego se compararán con los obtenidos a pH 7.0. Finalmente, se completa este estudio con experimentos en condiciones similares a las fisiológicas (37 $^{\circ}$ C y pH 7.0).

El análisis de los datos espectroscópicos de DC y UV-vis de la valoración con Pb(II) de Zn₃- β MT1 en condiciones estándar de trabajo (Fig. 62, Tabla 17), muestran que la adición del 1 $^{\circ}$ eq de Pb(II) provoca la aparición de nuevas absorciones análogas a las observadas en la valoración de Zn₇-MT1 con Pb(II), que revelan la coordinación de Pb(II) a la proteína.

En los espectros de DC (Fig. 62A) se observan siete máximos correspondientes a la coordinación Pb- β MT1: 226(-), 246 y 270(+), 316(-), 354(+) y 369(+) y 395(-) nm. Así también, en los espectros de UV-vis (Fig. 62B) aparecen las cuatro absorciones 250, 330 (más intensa), 375 y 400 nm que denominamos de *tipo I*. En ambos espectros, DC y UV-vis, se ha observado que el conjunto de absorciones forman una huella espectral casi idéntica a la de Pb-MT1, evidenciando que estas proteínas se estructuran de la misma forma frente a Pb(II).

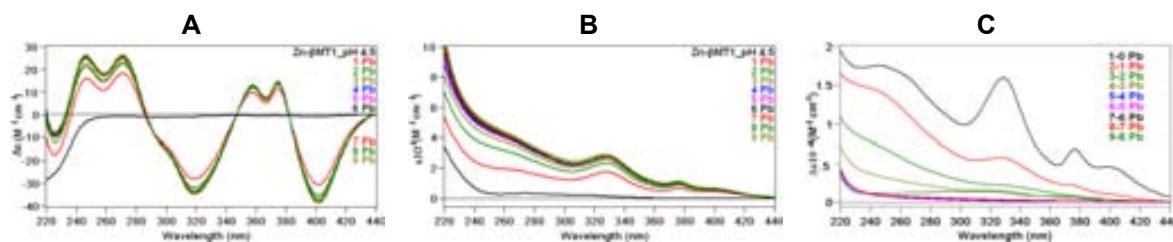


Figura 62. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT1}$ a pH 4.5 y 25 $^\circ\text{C}$ hasta 9 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

DC	UV-vis	dif. UV-vis
226(-), 246-270(+), 320(-), 358-375(+), 402(-) nm	250, 330, 375, 400 nm	250, 330, 375, 400 nm

Tabla 17. Absorciones correspondientes a los espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis de la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT1}$ a pH 4.5 y 25 $^\circ\text{C}$ hasta 9 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Por su parte, los espectros de dif. UV-vis (Fig. 62C) muestran dos conjuntos de absorciones, para el 1 $^\circ$ eq de Pb(II) aparecen las de *tipo I* características del enlace Pb-MT1 y reflejadas en el UV-vis, pero al adicionar el 2 $^\circ$ eq de Pb(II) estas se hacen menos intensas. A partir del 3 $^\circ$ eq de Pb(II) las absorciones varían a las de *tipo II*, 250 y 340 nm.

Las señales espectroscópicas de DC y UV-vis muestran una saturación a partir de la adición del 2 $^\circ$ eq de Pb(II) , pero las absorciones siguen aumentando levemente su intensidad hasta el 4 $^\circ$ eq de Pb(II) . En la gráfica de la absorbancia vs. eq de Pb(II) (Fig. 63) se observan dos puntos de equivalencia cercanos al 2 $^\circ$ y otro al 4 $^\circ$ eq de Pb(II) .

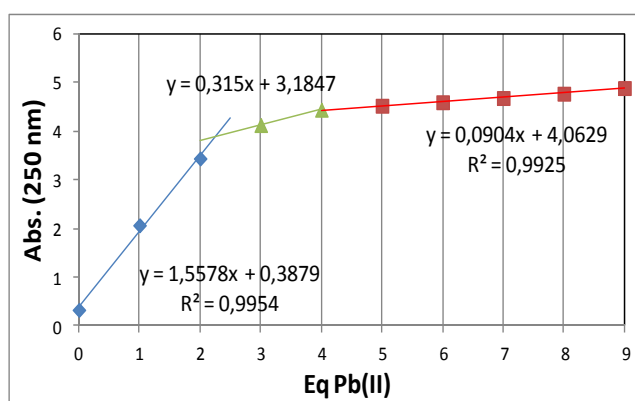


Figura 63. Gráfica de absorbancia a 250 nm vs. eq de Pb(II) , de la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT1}$ a pH 4.5 y 25 $^\circ\text{C}$ hasta 9 eq de Pb(II) añadidos concediendo máx. t_{est} .

Además, en esta valoración se observó, tanto en los espectros de DC y UV-vis (Fig. 64), que el tiempo de estabilización de los dos primeros equivalentes de Pb(II) era bastante largo (para el 1 $^\circ$ eq de Pb(II) unas 20 horas y para el 2 $^\circ$ eq de Pb(II) cerca de 2 horas), y en cambio a partir del 3 $^\circ$ eq de Pb(II) añadido ya no hay variación de la huella espectral respecto al tiempo. Los t_{est} largos para el 1 $^\circ$ y 2 $^\circ$ eq de Pb(II) tienen relación

con la coordinación que presentan en la proteína mostrando absorciones de *tipo I*, revelando que el sitio donde se unen estas iones en la proteína requiere un mayor estabilidad y/o estructuración.

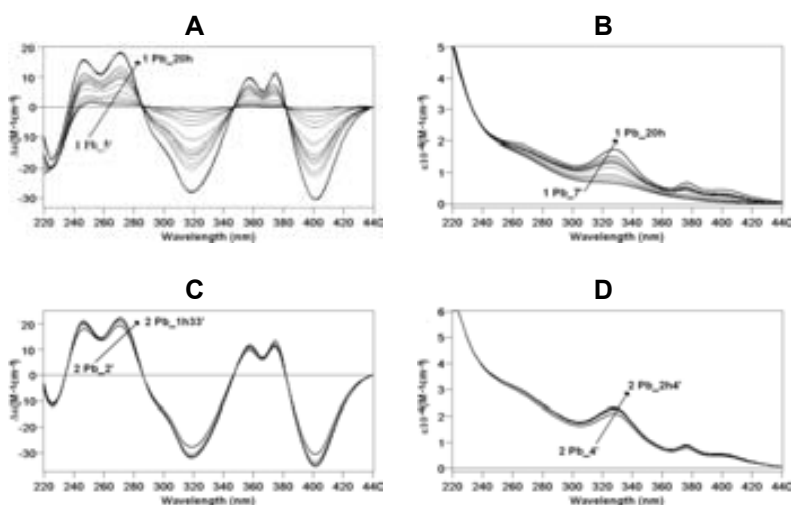


Figura 64. Espectros de (A y C) DC y (B y D) UV-vis de la valoración de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT1 a pH 4.5 y 25 °C, que muestra la evolución espectral respecto al t_{est} para el 1° eq de Pb(II) (arriba) y 2° eq de Pb(II) (abajo) añadido.

En relación al gran tiempo de estabilización que existe para los dos primeros equivalentes de Pb(II) se decidió realizar una nueva valoración de Zn₃- β MT1 a pH 4.5, pero aumentando la temperatura a 55 °C, al igual que en el caso de Zn₇-MT1. En los espectros de DC y UV-vis (Fig. 65) se observó la aparición de las mismas absorciones que a 25 °C y asimismo la saturación de las señales espectroscópicas, se da primero parcialmente para el 2° eq de Pb(II) y finalmente, para el 4° eq de Pb(II). El aumento de temperatura disminuyó el t_{est} del 1° eq de Pb(II) de unas 20 horas a 2 h 30'.

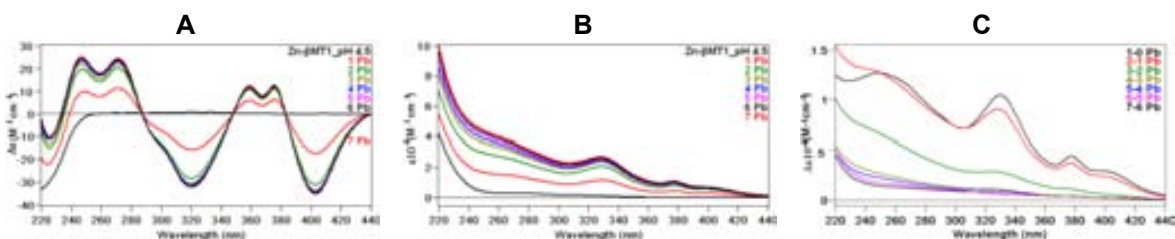


Figura 65. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT1 a pH 4.5 y 55 °C hasta 7 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 64C) se puede observar que el 1° y 2° eq de Pb(II) presentan las cuatro absorciones características de *tipo I* y a partir del 3° eq de Pb(II) hay una variación en el tipo de coordinación. En cambio, en la valoración a 25 °C, sólo la contribución del 1° eq de Pb(II) muestra las absorciones de *tipo I* bien definidas.

Por su parte, al comparar los espectros de DC y UV-vis de ambas valoraciones, se puede observar que la entrada del 1° y 2° eq de Pb(II) lleva un t_{est} específico en la proteína (Fig. 64 y 66), en donde las señales espectroscópicas aumentan (positiva y negativamente) de manera isodicroica durante el tiempo, de manera análoga a Zn₇-MT1 en presencia de Pb(II). Además en los espectros de dif. UV-vis, se observan para ambos equivalentes las mismas absorciones. Esto revela que los dos primeros iones plomo(II) podrían tener un sitio de coordinación idéntico y específico dentro del dominio Zn₃-βMT1, y por esto son los únicos que requieren un mayor tiempo para que la proteína se estabilice frente a ellos.

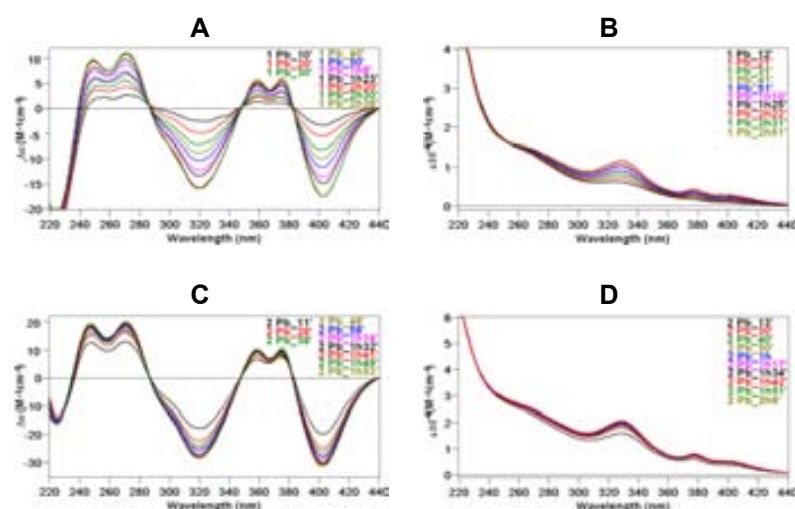


Figura 66. Espectros de DC y UV-vis que muestra la evolución espectral respecto al tiempo de estabilización para el (A y B) 1° y (C y D) 2° eq de Pb(II) añadido en la valoración de una solución 20 μM de Zn₃-βMT1 a pH 4.5 y 55 °C.

Al igual que en Zn₇-MT1 y en Zn₄-αMT1, se estudió la interacción de los iones Pb(II) en Zn₃-βMT1 a pH neutro, para esto se realizó la valoración de una solución 20 μM de este dominio, a 55 °C (Fig. 67).

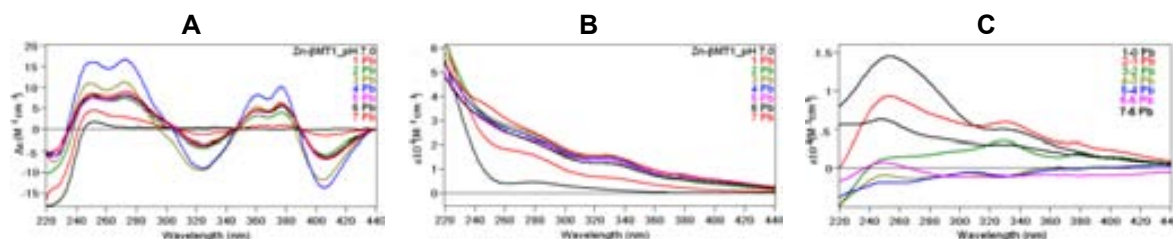


Figura 67. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μM de Zn₃-βMT1 a pH 7.0 y 55 °C hasta 7 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC muestran que la adición del 1° eq de Pb(II) provoca la aparición de absorciones características de la coordinación de Pb(II) en el dominio Zn₃-βMT1, pero éstas no reflejan una huella espectral definida e isodicroica, como en la valoración

a pH 4.5. El máximo aporte se da para el 4° eq de Pb(II) añadido y luego disminuye la intensidad de las señales tras la adición del 5° eq de Pb(II), debido a la posible desestructuración de la proteína al tener un exceso de iones plomo (II).

En los espectros de dif. UV-vis se observa que hay diferentes grupos de absorciones (*tipo I y II*) dependiendo de la contribución de los equivalentes de Pb(II) añadidos, que indican que el ión Pb (II) se coordina a la proteína de diversas maneras, por lo que la formación de las especies Pb- β MT1 no se da por un proceso cooperativo, es decir, no hay una sola especie, sino especies intermedias.

Una vez observadas las señales espectroscópicas del dominio Zn₃- β MT1 frente a Pb(II) a pH 4.5 y 7.0, éstas muestran una diferencia en la definición e intensidad de las absorciones, que revelan que a pH 4.5 hay una mayor estructuración de los clústeres Pb- β MT1 formados, esto se puede observar en la Fig. 68 donde se comparan los espectros de DC y UV-vis del 4° eq de Pb(II) añadido a este fragmento a ambos pHs.

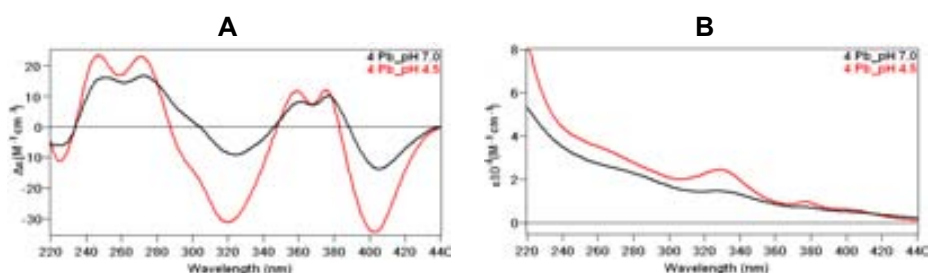


Figura 68. Espectros de (A) DC y (B) UV-vis del 4° eq de Pb(II) añadido en las valoraciones de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT1 a pH 7.0 y 4.5, a 55 °C

Por otra parte, la valoración de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT1 en condiciones similares a las fisiológicas, a pH 7.0 y 37 °C, reveló que la adición de los iones Pb(II) provoca una nueva estructuración de este dominio, mostrando la aparición de señales (Fig. 69A) semejantes a las observadas en la valoración de Zn₇-MT1 con Pb(II) en iguales condiciones.

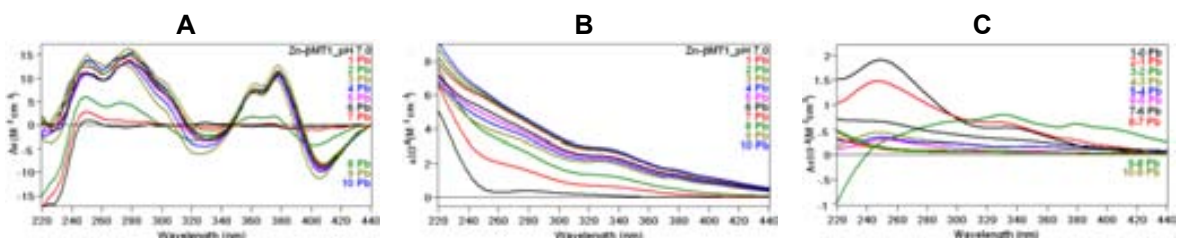


Figura 69. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT1 a pH 7.0 y 37 °C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC muestran algunos puntos isodicroicos que varían dependiendo de los equivalentes de Pb(II) añadidos. En los espectros de UV-vis (Fig. 69B) sólo se

observan tres absorciones: 250, 330, 375 nm, a diferencia de lo observado a pH 4.5 en donde aparecen las cuatro bandas, denominadas de *tipo I*, que incluyen la absorción a 400 nm. La saturación de las señales espectroscópicas de DC y UV-vis se da tras la coordinación del 3° eq de Pb(II).

En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 69C), se observa una variación de las absorciones dependiendo del número de iones Pb(II) añadidos: en donde el 1° eq de Pb(II) muestra señales de *tipo II*, mientras que el 2° eq de Pb(II) presenta las tres bandas que se observan por UV-vis. La incorporación del 3° eq de Pb(II) provoca un cambio notable en las señales y tras la adición del 4° eq de Pb(II) ya no se observa un aporte en las señales del UV-vis. Así también en el DC los máximos disminuyen su intensidad indicando una disminución de la quiralidad de las especies Pb- β MT1 formadas.

En esta valoración los t_{est} son largos al igual que en las valoraciones anteriores en las diferentes condiciones, en la Fig. 70 se muestra un ejemplo de la evolución de los espectros respecto al tiempo para el 3° eq de Pb(II) añadido a Zn₃- β MT1.

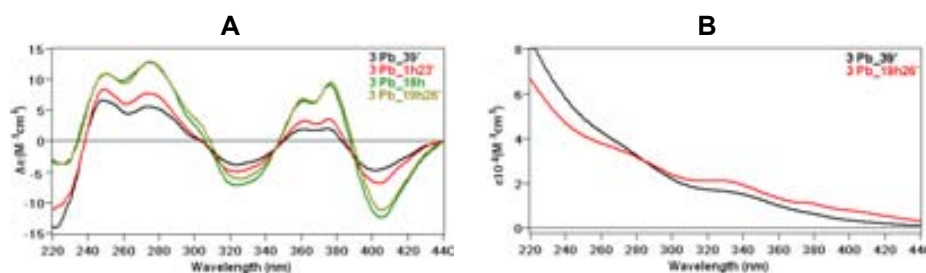


Figura 70. Evolución respecto al t_{est} de los espectros de (A) DC y (B) UV-vis registrados para el 3° eq de Pb(II) añadido en la valoración de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT1 a pH 7.0 y 37 °C.

Así el conjunto de resultados obtenidos en los espectros de DC y UV-vis, nos indican que al adicionar los iones Pb(II) a Zn₃- β MT1, éstos se coordinan provocando la aparición de absorciones características similares a las observadas en Zn₇-MT1 en presencia de Pb(II). Las señales espectroscópicas de las especies formadas se saturan entre 2 y 4 iones Pb(II), tanto a pH 4.5 como a pH 7.0. Esto se diferencia del comportamiento de Zn₃- β MT1 frente a Pb(II) en condiciones fisiológicas, que se satura para el 3° eq de Pb(II) añadido.

2.1.3.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS

Los experimentos realizados mediante ESI-MS se llevaron a cabo siguiendo dos metodologías: la primera añadiendo la misma cantidad de Pb(II) que el contenido de Zn(II) inicial, o sea, 3 iones Pb(II); y la segunda añadiendo un gran exceso, 12 equivalentes de Pb(II), cada una a las correspondientes preparaciones de una solución

20 μ M de Zn₃- β MT1 a 25 °C y pH 7.0. Estas muestras fueron analizadas a lo largo de 12 horas con el fin de observar la evolución de las especies formadas.

El análisis de los resultados obtenidos en estas condiciones muestran que, la adición de 3 iones Pb(II) a la solución proteica da lugar a la formación de especies, tanto homometálicas como heterometálicas Pb,Zn- β MT1 (Fig. 71A). Desde un primer momento se observó que la especie más abundante es Pb₄- β MT1, seguida de otras de menor abundancia: Pb₃Zn₁⁻, Pb₁Zn₂⁻, Pb₂⁻, Pb₂Zn₂⁻, Pb₃⁻, Pb₃Zn₁⁻, Pb₄Zn₁⁻, Pb₅- β MT1 y el clúster inicial Zn₃- β MT1 es casi nulo. A medida que pasa el tiempo, el pico de Pb₄- β MT1 mantiene su intensidad y las otras especies homó y heterometálicas están presentes durante 12 horas. A partir de 1 hora la especie de partida Zn₃- β MT1 va aumentando en abundancia hasta las 8 horas y luego disminuye.

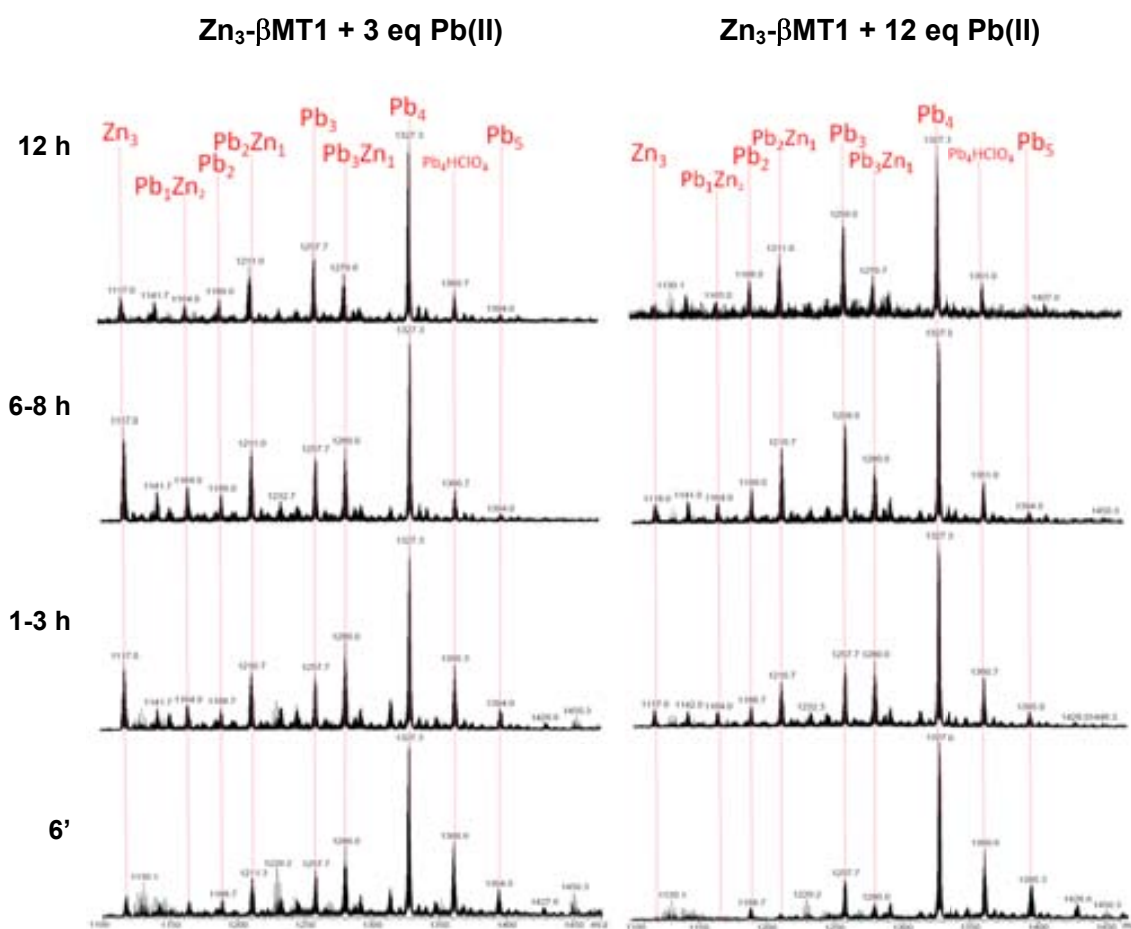


Figura 71. Espectros de ESI-MS registrados durante 12 horas que muestran la evolución de una solución de Zn₃- β MT1 20 μ M, a pH 7.0 y 25 °C, tras la adición de 3 y 12 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +3, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio, con excepción de Pb₄(HClO₄).

En el segundo experimento al añadir 12 eq de Pb(II), los espectros de masas registrados muestran la formación de especies homó y heterometálicas Pb,Zn- β MT1

(Fig. 71B) . Desde un primer momento se observó mayoritariamente especies homometálicas de Pb(II), siendo la más abundante $Pb_4\text{-}\beta\text{MT1}$ y se mantiene estable hasta las 12 horas, y luego de menor abundancia $Pb_3\text{-}\beta\text{MT1}$. Los otros clústeres son: Pb_2Zn_{1-} , Pb_{2-} , Pb_2Zn_{2-} , Pb_3Zn_{1-} , Pb_4Zn_{1-} , $Pb_5\text{-}\beta\text{MT1}$. A partir de 1 h, estas especies varían su abundancia y se mantienen hasta las 3 horas, y a las 12 horas se observa mayoritariamente clústeres homometálicos de Pb(II) y la especie inicial $Zn_3\text{-}\beta\text{MT1}$ es casi nula.

Los resultados obtenidos por ESI-MS de ambos experimentos muestran que la especie más abundante es $Pb_4\text{-}\beta\text{MT1}$, que se puede relacionar con la saturación de las señales por espectroscopía de DC y UV-vis observadas para el 4° eq de Pb(II) añadido, en similares condiciones experimentales, pH 7.0 y 25 °C. La principal diferencia provocada por la cantidad de Pb(II) añadida, es la abundancia de la especie inicial $Zn_3\text{-}\beta\text{MT1}$, sólo casi nula en exceso de plomo. En ambas condiciones se forman especies heterometálicas $Pb,Zn\text{-}\beta\text{MT1}$ que coordinan un total de 3 o 4 iones y las homometálicas coordinan como máximo 5 iones Pb(II).

2.1.3.3. Estudio por microcalorimetría, ITC

En el estudio por ITC se realizó la valoración con Pb(II) de $Zn_3\text{-}\beta\text{MT1}$ para obtener parámetros termodinámicos de la incorporación de los iones Pb(II) a la proteína, para esto se lleva a cabo un experimento en las condiciones fijadas como estándar para el estudio espectroscópico, es decir, una muestra de solución 20 μM de proteína a pH 4.5 y a 25 °C y se añaden consecutivamente los equivalentes de Pb(II) hasta completar la saturación del dominio $Zn_3\text{-}\beta\text{MT1}$.

$K \times 10^{-5}$	ΔG (cal/mol)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/molK)	N (Eq de Pb(II))
2.43 ± 0.178	-7339	-8986 ± 148	-5.41	2.02 ± 0.03

Tabla 18. Datos termodinámicos obtenidos a partir del experimento de ITC de la valoración de $Zn_3\text{-}\beta\text{MT1}$ a 20 μM , a pH 4.5 y 25 °C, con Pb(II). El resultado de ΔG se ha obtenido a partir de la fórmula $\Delta G = -RT \ln K$.

Los resultados obtenidos a través de la valoración por ITC (Fig. 72, Tabla 18) señalan que el proceso de intercambio de los iones Zn(II) por Pb(II) está favorecido termodinámicamente con un ΔG de -7339 cal/mol, se da en un proceso entrópicamente negativo ($\Delta S = -5.41$ cal/molK), es decir, que los nuevos clústeres de Pb(II) formados presentan un mayor orden que los iniciales de Zn(II), por lo que el proceso de formación requiere mayor energía o calor, que se corrobora con el valor de diferencia de entalpía (ΔH) de -8986 cal/mol, reflejando así un proceso exotérmico.

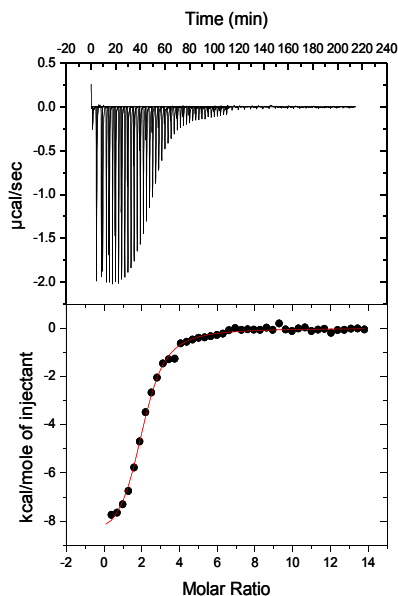


Figura 72. Termograma (arriba) y representación del calor desprendido (abajo) frente a los equivalentes de Pb(II) añadidos a una solución 20.06 μ M de Zn₃- β MT1 con Pb(II) a pH 4.5 y 25 °C, de acuerdo con la metodología descrita en los apartados III y VI-2.

La curva de ITC muestra un número de equivalencia (N) de 2 iones Pb(II), donde se observó que la curva experimental y la teórica (Fig. 72) coincidían, indicando así que el número de sitios de coordinación son idénticos para los dos iones Pb(II) incorporados a la proteína, esto corrobora lo observado en los espectros de DC y UV-vis y más claramente en los de diferencia de UV-vis, que muestran el mismo tipo de absorciones para el 1° y 2° eq de Pb(II), es decir, un mismo entorno de coordinación. Así también en la curva de la valoración se observó un cambio para el 4° eq de Pb(II) añadido, que podría indicar un punto de saturación de la proteína, este número de iones ya se observó en los espectros de DC y UV-vis, además en los espectros ESI-MS se observó que la especie más abundante corresponde a Pb₄- β MT1.

2.1.4. Análisis global del estudio de la habilidad coordinante de la isoforma MT1 y sus dominios α y β frente a Pb(II)

A partir de los resultados obtenidos en el estudio de la interacción de Pb(II) con Zn₇-MT1 y sus dominios Zn₄- α MT1 y Zn₃- β MT1 por las espectroscopías de DC y UV-vis, espectrometría de masas y por ITC, podemos señalar que:

En la isoforma MT1 se observó la saturación de las señales espectroscópicas a partir del 5° y 9° eq de Pb(II), a pH 4.5 y a pH 7.0, respectivamente. En condiciones de pH 4.5, los procesos son isodicroicos, indicando que probablemente los complejos Pb-MT1 se forman de manera cooperativa, o sea, que hay una evolución del agregado inicial al final sin formación de especies intermedias. Además, se pudo observar que todos los equivalentes de Pb(II) hasta la saturación de la proteína contribuyen a formar cuatro absorciones características denominadas “*tipo I*”, es decir, sólo hay un mismo entorno

de coordinación de los iones Pb(II). En cambio a pH 7.0, se observó que la formación de los clústeres Pb-MT1 siguen un proceso diferente, mostrando más de un tipo de absorción en el espectro de dif. UV-vis, de “*tipo I*” al igual que a pH 4.5 y de “*tipo II*” (similar a las de la especie Pb-SCys₃ de geometría piramidal trigonal), mostrando entornos de coordinación diferentes frente al ión Pb (II). Esto se corroboró con los experimentos de ITC, en donde las curvas muestran que existe más de un sitio de enlace de Pb(II) en MT1, y que se coordinan aproximadamente entre 8 y 9 iones Pb(II). Adicionalmente, los espectros de ESI-MS muestran la formación de especies homo- y heterometálicas de Pb(II) y Zn(II), revelando que Zn₇-MT1 enlaza los iones Pb(II) desplazando algunos iones Zn(II), pero no necesariamente libera todo el Zn(II) inicial. Se observó una especie importante Pb₄Zn₄-MT1 que apoya la idea de un proceso menos cooperativo a pH 7.0. El hecho de que al sustituir un Zn(II) por uno o más iones Pb(II), revela que este metal no se enlaza en el mismo sitio ni de la misma forma que los iones Zn(II) iniciales. Las especies formadas más abundantes son Pb₉-MT1 y Pb₁₀-MT1.

En el dominio α MT1 se observó la saturación de las señales espectroscópicas para 6 iones Pb(II) en condiciones de pH 4.5, con un proceso no cooperativo, en donde hay formación de especies intermedias antes de la saturación de la proteína. En cambio a pH 7.0, se necesita de un exceso de iones Pb(II) para evidenciar la formación de enlaces Pb- α MT1. Aún así, los espectros de masas muestran que la especie más estable es la inicial Zn₄- α MT1, pero también se observan especies mixtas de Pb(II) y Zn(II) menos abundantes y especies homometálicas de hasta Pb₆- α MT1.

La valoración por ITC muestra un número de 6 iones Pb(II) coordinados, pero estos no tienen el mismo sitio de coordinación como se refleja por espectroscopía de UV-vis. Por su parte, los resultados por ESI-MS muestran que las especies formadas más abundantes son diferentes dependiendo del pH de la reacción: a 4.5 es Pb₆- α MT1 y a pH 7.0 se mantiene la especie inicial Zn₄- α MT1.

En el dominio β MT1 la saturación de las señales espectroscópicas se da entre 2 y 4 iones Pb(II), tanto a pH 4.5 como a 7.0, y los dos primeros equivalentes presentan las absorciones de “*tipo I*”, que indican un mismo tipo de coordinación en la proteína. Esto se corroboró con la valoración por ITC que muestra un número de sitios de coordinación idénticos para los dos primeros equivalentes de Pb(II). Además en los espectros de masas, se observa la formación de especies Pb₄- β MT1 como la más abundante, que coincide con la saturación de las señales espectroscópicas de DC y UV-vis, para 4 iones Pb(II), tanto a pH ácido como neutro.

Finalmente, el estudio de la habilidad coordinante de la isoforma MT1 de mamífero y sus dominios α y β frente a Pb (II) muestran que los fragmentos se comportan de

manera dependiente en la proteína entera, y el fragmento β tiene un plegamiento similar a MT1 frente a Pb(II) que se evidencia por las mismas absorciones del DC, que podría indicar que este es el dominio más dominante dentro de la proteína entera.

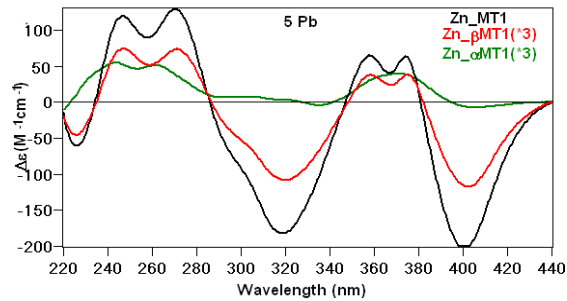


Figura 73. Espectros de DC del 5° eq de Pb(II) de las valoraciones de Zn-MT1, Zn- α MT1 y Zn- β MT1 con Pb(II) a pH 4.5 y 37 °C, que muestra las absorciones formadas para cada proteína.

2.2. Habilidad coordinante de la isoforma MT2 de mamífero y sus dominios α y β frente a Pb(II)

2.2.1. Isoforma MT2 de mamífero

2.2.1.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis

De acuerdo a los antecedentes presentados anteriormente en la metodología de trabajo, se ha estudiado Zn₇-MT2 frente a Pb(II) mediante las correspondientes valoraciones registradas por espectroscopía de DC y UV-vis, fijando las siguientes condiciones experimentales:

Concentración (μ M)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	pH	
10	37	4.5	7.0
20	37	7.0	
5			
10	25	7.0	
	55		

Tabla 19. Condiciones experimentales de las valoraciones de Zn₇-MT2 con Pb(II) para el estudio espectroscópico de DC y UV-vis.

El análisis de los resultados obtenidos en las valoraciones de Zn₇-MT2 frente a Pb(II) se ha realizado a partir del experimento en las condiciones estándar; una solución 10 μ M de proteína, a pH 4.5 y 37 $^{\circ}$ C, para así continuar analizando los otros experimentos con la variación de los diferentes factores descritos anteriormente.

Los datos espectroscópicos de la valoración Zn₇-MT2 con Pb(II) bajo las variables estándar de trabajo, revelan la aparición de nuevas absorciones intensas y características, tanto en los espectros de DC y UV-vis, correspondientes a la coordinación de este ión metálico a la metalotioneína (Fig. 74, Tabla 20), siendo estas señales análogas a las observadas en la valoración de Zn₇-MT1 en presencia de Pb(II).

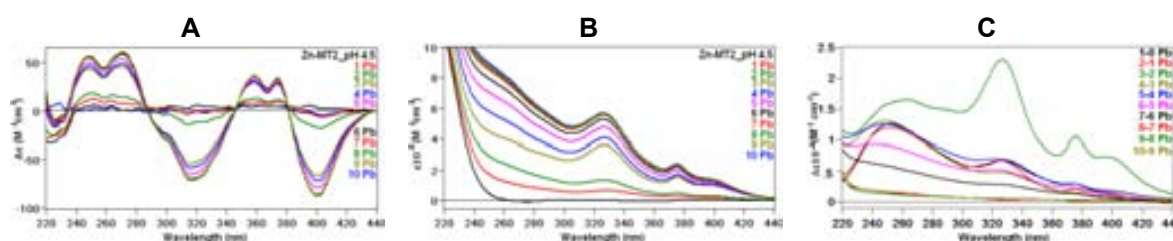


Figura 74. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT2 a pH 4.5 y 37 $^{\circ}$ C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

DC	UV-vis	dif. UV-vis
228(-), 248-271(+), 316(-), 358-374(+), 400(-) nm	250, 330, 375, 400 nm	250, 330, 375, 400 nm

Tabla 20. Absorciones correspondientes a los espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis de la valoración de Zn₇-MT2 a 10 μ M, pH 4.5 y 37 $^{\circ}$ C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Las señales espectroscópicas de DC y UV-vis, indican una variación espectral desde la adición del 1° eq de Pb(II) hasta llegar a un punto de saturación para el 6° eq de Pb(II), tal como se puede ver en la Fig. 75. Los espectros alcanzan su máxima intensidad tras la adición de 6 iones plomo(II), mientras que las adiciones posteriores no modifican la forma y la intensidad de los espectros, es decir, la muestra de proteína mantiene la quiralidad de las especies Pb-MT2 formadas.

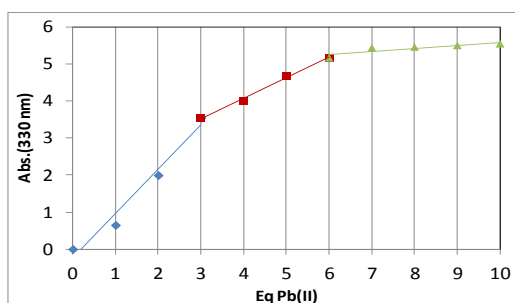


Figura 75. Gráfica de absorción a 330 nm vs. eq de Pb(II) de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT2 a pH 4.5 y 37 °C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 74A) muestran siete absorciones análogas a las observadas en Zn₇-MT1 tras la adición de Pb(II), pero algunas de estas bandas son menos definidas y sus máximos se desplazan levemente (358(+)) y 374(+) nm). Además, se puede observar la aparición de un pequeño hombro a 303 (-) nm en el segundo máximo negativo. Las señales de DC muestran un proceso isodicroico con tres puntos a 286, 346 y 380 nm, muy semejante al observado en Zn₇-MT1 en presencia de Pb(II), indicando así un proceso cooperativo al coordinarse el ión Pb(II) a Zn₇-MT2.

Por su parte, en los espectros de UV-vis (Fig. 74B) se observan las cuatro absorciones (250, 330, 375 y 400 nm) asignadas anteriormente como las de *tipo I*, que evidencian la formación del enlace Pb-MT2. En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 76) se observan que desde el 1° hasta el 6° eq de Pb(II) se mantienen las mismas absorciones, pero sólo la contribución del 3° eq de Pb(II) (Fig. 76A) provoca bandas más intensas y bien definidas análogas a las de Zn₇-MT1 a pH 4.5 al enlazar Pb(II). Una vez saturada la proteína no se observan nuevas absorciones, como se puede ver en la Fig. 76C.

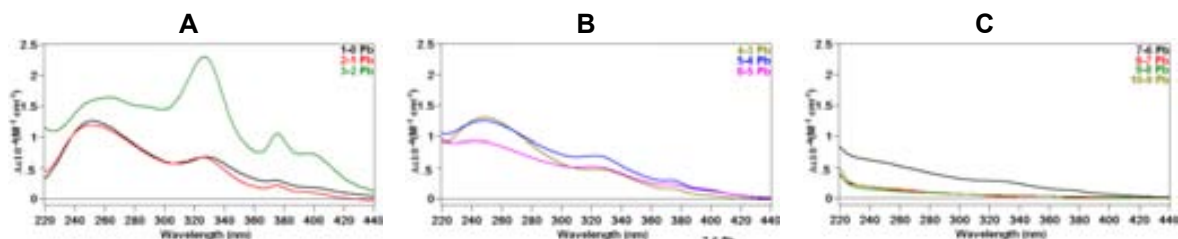


Figura 76. Espectros de dif. UV-vis del (A) 1° al 3°, (B) 4° al 6° y (C) 7° al 10° eq de Pb(II) añadidos en la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT2 a pH 4.5 y 37 °C con máx. t_{est} .

Así una vez evidenciada la coordinación de Pb(II) a Zn₇-MT2 a pH 4.5, se ha decidido estudiar el efecto que tiene el pH en la formación de las especies Pb-MT2.

Para esto se ha realizado una valoración de Zn₇-MT2 con Pb(II) en condiciones análogas a las estándar pero variando el pH a 7.0 (Fig. 77). El análisis de los datos espectroscópicos reveló la coordinación de Pb(II) a Zn₇-MT2 provocando en los espectros de DC la aparición de absorciones semejantes (Fig. 77A) a las observadas anteriormente a pH 4.5, pero con algunas variaciones como bandas menos definidas y una evolución distinta de las señales por cada equivalente de Pb(II) añadido. En cambio, los espectros de UV-vis (Fig. 77B) muestran absorciones diferentes a las obtenidas a pH 4.5.

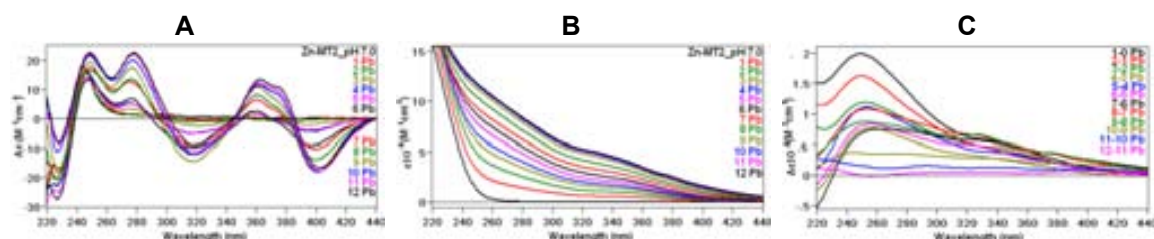
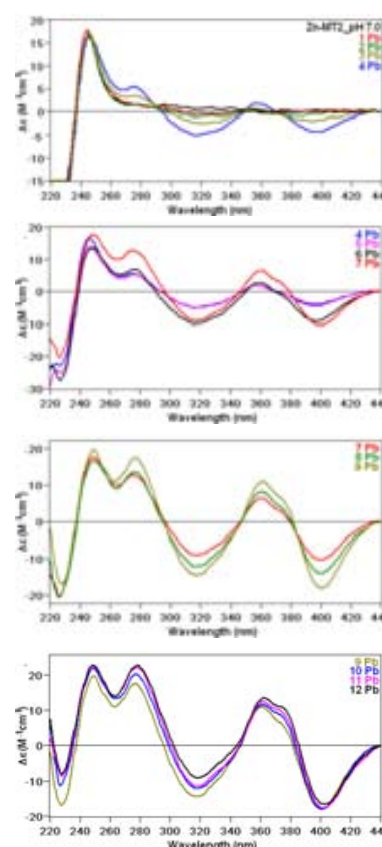


Figura 77. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 10 μM de Zn₇-MT2 a pH 7.0 y 37 °C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 78) muestran un proceso parcialmente isodicroico; ya que se observa una evolución de las absorciones en más de una etapa, siendo la primera desde el 1° al 4° eq de Pb(II) donde se observa el segundo máximo positivo (358 nm). A partir del 5° eq de Pb(II) este espectro no varía, pero al añadir más iones plomo los máximos negativos se hacen más intensos. La adición del 7° eq de Pb(II) provoca un leve desplazamiento de las señales, éstas siguen aumentando su intensidad hasta el 9° eq y a medida que se añaden más Pb(II) las bandas se desplazan hacia arriba, que es consecuencia de la saturación de la proteína.

Figura 78. Evolución de los espectros de DC de la valoración de una solución 10 μM de Zn₇-MT2 a pH 7.0 y 37 °C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .



En los espectros de UV-vis (Fig. 79A) se observaron sólo dos absorciones a 258 y 350 nm similares a las de *tipo II*, (reflejando según los antecedentes bibliográficos la posible unión de Pb(II) por medio de tres SCys con una geometría piramidal trigonal).

Los espectros de dif. UV-vis (Fig. 79B) muestran una variación de las absorciones por iones Pb(II) añadidos, siendo similares desde el 1° hasta el 5° eq de Pb(II) mostrando bandas de *tipo II* (258 y 350 nm) y a partir del 6° eq de Pb(II) aparecen otras señales, revelando una posible variación del entorno de coordinación de los clústeres Pb-MT2 formados.

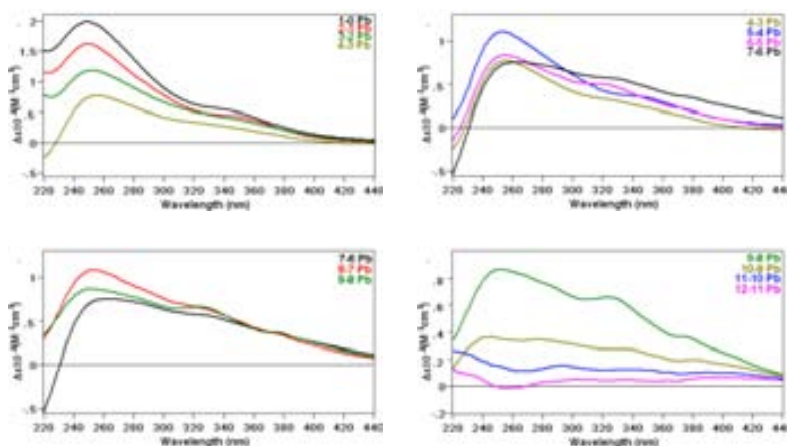


Figura 79. Espectros de dif. UV-vis de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT2 a pH 7.0 y 37 °C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Las señales espectroscópicas muestran una saturación a partir del 10° eq de Pb(II), que se puede observar en la gráfica de absorbancia en función de los equivalentes de Pb(II) añadidos a la proteína (Fig. 80), mostrando un punto de equivalencia para Pb₁₀ y mientras se adicionan más iones plomo(II) la saturación de la proteína es más visible.

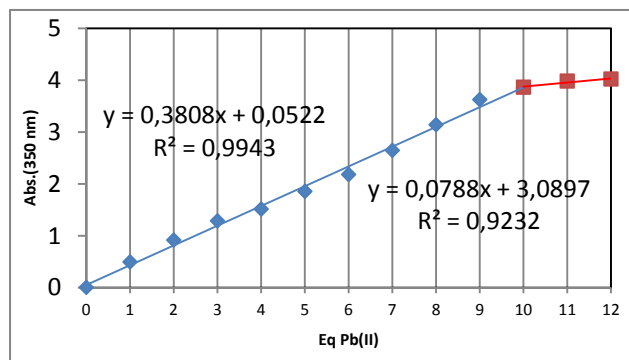


Figura 80. Variación de la absorción a una λ determinada (350 nm) vs. número de equivalentes de Pb(II) añadidos a lo largo de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT2 con Pb(ClO₄)₂, a pH 7.0 y a 37 °C.

Otro de los factores que se ha analizado es la concentración de Zn₇-MT2, para conocer el posible efecto sobre la habilidad coordinante de Pb(II) en esta proteína, para esto se realizaron dos nuevas valoraciones con Pb(II); una solución 20 μ M de Zn₇-MT2 y otra de menor concentración, a 5 μ M, ambas en condiciones de pH 7.0 y 37 °C. En ambos experimentos se observaron la aparición de absorciones similares a las observadas a 10 μ M, pero la evolución espectral es diferente para cada una de las concentraciones.

Así, cuando se adiciona Pb(II) a una solución 20 μM de Zn₇-MT2 los espectros de DC y UV-vis (Fig. 81A-B) muestran señales características de la coordinación de estos iones a la metalotioneína.

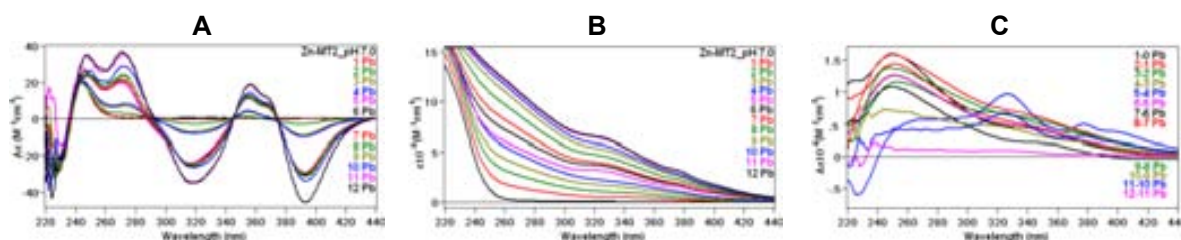


Figura 81. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μM de Zn₇-MT2 a pH 7.0 y 37 °C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

En los espectros de DC (Fig. 81A) se observan bandas más intensas que en la valoración a 10 μM y, en los espectros de UV-vis (Fig. 81B) aparecen nuevas absorciones a partir del 5° eq de Pb(II), así como también se observó en los espectros de dif. UV-vis (Fig. 81C).

En la valoración de Zn₇-MT2 a 5 μM la adición de los equivalentes de Pb(II) provoca la aparición de absorciones poco definidas e intensas en el DC (Fig. 82A), incluso no se observa la absorción a 375(+) nm, que se diferencia de las valoraciones anteriores. Sin embargo, los espectros de UV-vis (Fig. 82B) muestran bandas similares a las observadas en las otras concentraciones.

En ambas valoraciones, a concentraciones 5 y 20 μM , las señales espectroscópicas de DC y UV-vis se saturan a partir de la adición del 10° eq de Pb(II).

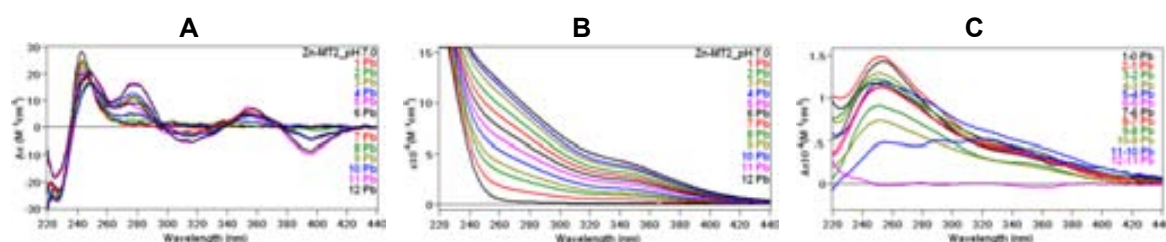


Figura 82. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 5 μM de Zn₇-MT2 a pH 7.0 y 37 °C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Por medio de los datos de DC y UV-vis recogidos en estas valoraciones se ha observado que los t_{est} de los iones Pb(II) en Zn₇-MT2 son largos para los primeros equivalentes añadidos, superior a 4 horas. Por esta razón se ha decidido aumentar la temperatura para así acelerar la reacción y estudiar el posible efecto de ésta en la coordinación de Pb(II) a esta MT, tal y como se mencionó en la metodología. Para esto

se han realizado las valoraciones con Pb(II) de soluciones 10 μ M de Zn₇-MT2, a pH neutro, a dos temperaturas diferentes: una a 25 °C y otra a 55 °C.

El análisis de los datos espectroscópicos de la valoración a temperatura ambiente muestra que al adicionar Pb(II) a Zn₇-MT2 aparecen absorciones análogas a las observadas en el experimento a 37 °C, pero se diferencian en que las bandas del DC alrededor de 358(+) y 375(+) nm son menos definidas (Fig. 83A). Esto revela que hay una menor estructuración de la proteína y disminuye la quiralidad de los agregados Pb-MT2 formados, pudiendo ser efecto que a menor temperatura no se facilite la entrada del ión Pb(II) a Zn₇-MT2.

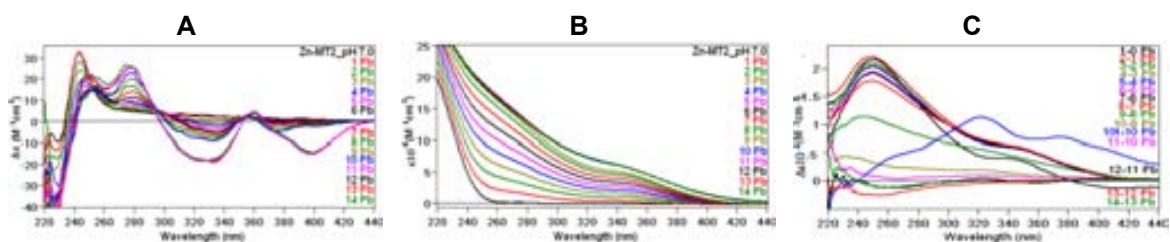


Figura 83. Espectros de (**A**) DC, (**B**) UV-vis y (**C**) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT2 a pH 7.0 y 25 °C hasta 14 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC y UV-vis (Fig. 83A -B) muestran una primera saturación alrededor del 10° eq de Pb(II) añadido y luego un aumento en la intensidad de las señales tras la adición del 11° eq de Pb(II) y su posterior saturación. Esto se debe a un mayor tiempo de estabilización dejado (1 noche) al registrar el 10° eq de Pb(II), revelando que la coordinación de Pb(II) a Zn₇-MT2 es lenta a temperatura ambiente.

Por su parte, el enlace de Pb(II) a Zn₇-MT2 a 55 °C, muestra absorciones análogas a las observadas a 37 °C (Fig. 84). El aumento de temperatura disminuyó los t_{est} por eq de Pb(II), sin embargo, esto provocó una pronta saturación de la proteína a partir de la adición del 5° eq de Pb(II) en el DC (Fig. 84A), observándose una solución turbia y un precipitado. Aunque los espectros de UV-vis (Fig. 84B) no muestran saturación de las señales. Y en los espectros de dif. UV-vis (Fig. 84C) se observan las absorciones de *tipo II*, pero al dejar un mayor t_{est} por equivalente de plomo(II) añadido aparecen otras bandas.

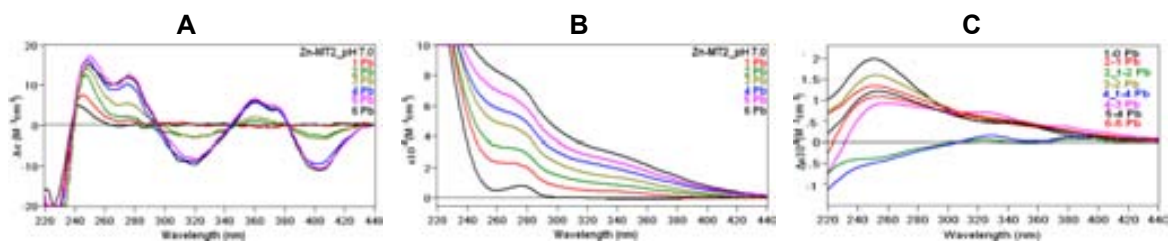


Figura 84. Espectros de (**A**) DC, (**B**) UV-vis y (**C**) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT2 a pH 7.0 y 55 °C hasta 14 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los resultados espectroscópicos obtenidos revelan la coordinación de Pb(II) a Zn₇-MT2 y las especies formadas pueden ser diferentes dependiendo del pH de la reacción: a 4.5 las más importantes son Pb₆Zn_y-MT2 y a pH 7.0 Pb₁₀Zn_y-MT2, donde y= 0-7. La incorporación de Pb(II) a la MT2 se pudo ver afectada por la temperatura y la concentración, esto se profundizará posteriormente en el apartado 3 (*“Análisis de los factores que afectan la capacidad coordinante de las MTs de mamífero frente a Pb(II)”*).

2.2.1.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS

En este estudio se presenta el análisis y comparación de los resultados obtenidos por espectrometría de masas de la interacción de Pb(II) con Zn₇-MT2. Tal y como se describió en la parte experimental, esta técnica nos permite obtener información sobre las especies que se forman al enlazarse el ión Pb(II) a la proteína, así como la evolución y estabilidad de las especies Pb-MT2 respecto al tiempo.

Los experimentos realizados mediante ESI-MS se llevaron a cabo siguiendo dos metodologías: añadiendo la misma cantidad de Pb(II) que el contenido de Zn(II) inicial; es decir, 7 eq de Pb(II); y otra añadiendo un gran exceso de 35 eq de Pb(II), a las correspondientes soluciones 10 μM de Zn₇-MT2 a 25 °C y pH 7.0. Estas muestras fueron analizadas a lo largo de 24 horas con el fin de observar la evolución de las especies formadas.

El análisis de los resultados obtenidos al adicionar 7 iones Pb(II) a la solución proteica mostró que la incorporación de plomo(II) da lugar a la formación de especies tanto homometálicas Pb-MT2 como heterometálicas Pb,Zn-MT2, como se puede observar en la Fig. 85.

En un primer momento (3 min) se puede apreciar que tras la adición de Pb(II), el pico más intenso corresponde al complejo Pb₇Zn₁⁻, seguido de Pb₈⁻, Pb₆Zn₂-MT2 y del inicial Zn₇-MT2, además aparecen otros picos de menor intensidad identificados como clústeres mixtos. A partir de 1 hora hasta las 3 horas, la especie Zn₇-MT2 desaparece y la intensidad relativa de los otros picos de Pb-MT2 aumenta considerablemente, siendo Pb₉-MT2 la especie mayoritaria, seguida de unas de menor intensidad como son Pb₈Zn₁⁻, Pb₇Zn₁⁻ y Pb₁₀-MT2, que coexisten entre otras.

A medida que avanza el tiempo de reacción hasta las 8 horas, el clúster Pb₉-MT2 sigue siendo el más abundante y se mantiene la relación con las otras especies, pero el pico de Zn₇-MT2 va aumentando en intensidad, mientras que Pb₁₀-MT2 va disminuyendo. Tras 12 horas, el clúster inicial Zn₇-MT2 aumenta su abundancia, sin embargo la especie Pb₉-MT2 se mantiene como la mayoritaria y por su parte, los complejos heterometálicos se hacen más visibles. Y al cabo de 24 horas, la especie

Zn₇-MT2 disminuye levemente y Pb₉-MT2 se hace más abundante, mientras las especies heterometálicas se mantienen en solución sumando entre 8 y 9 iones.

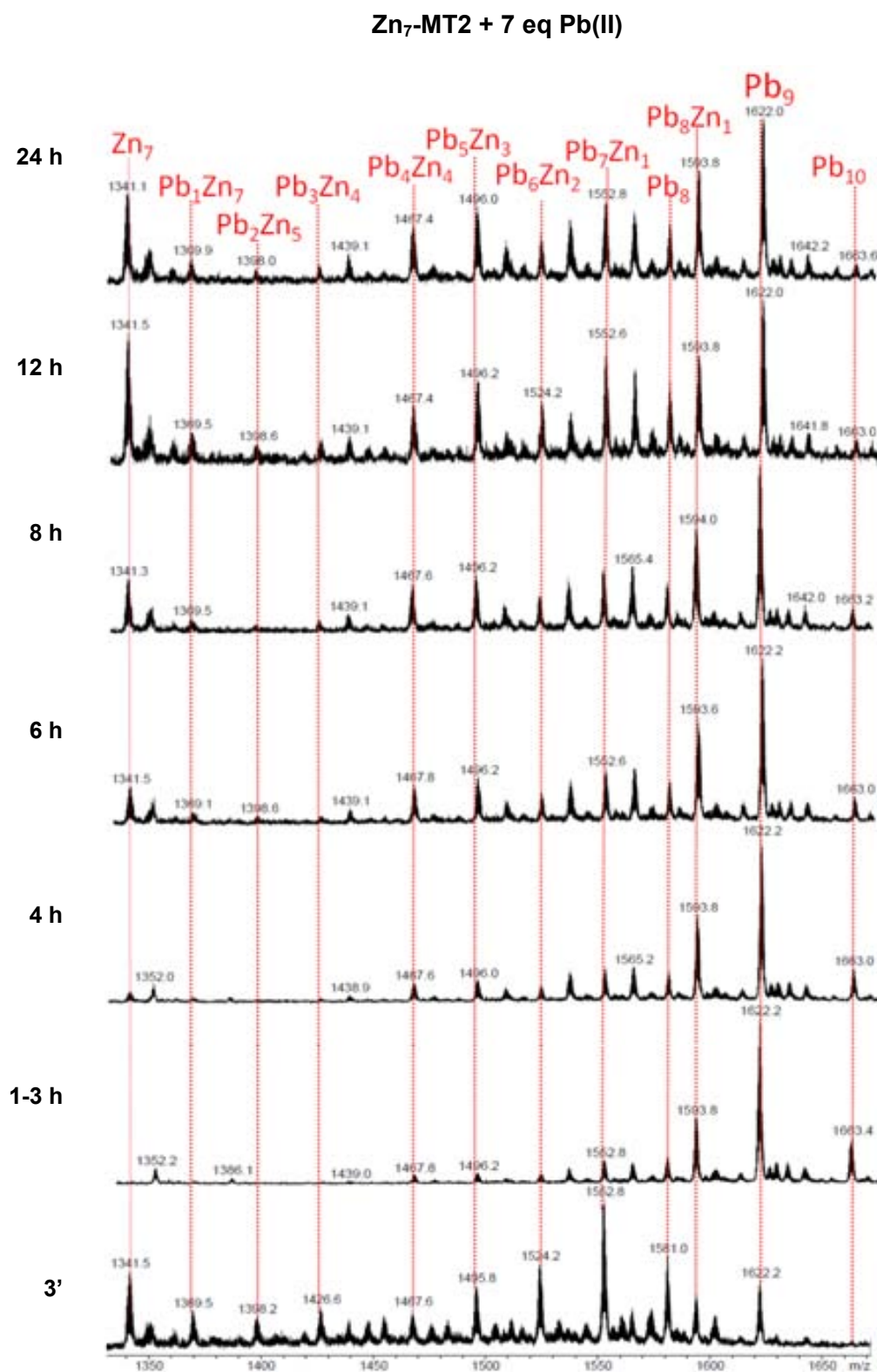


Figura 85. Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la evolución de una solución 10 μ M de Zn₇-MT2, a pH 7.0 y 25 °C, tras la adición de 7 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +5, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

En el segundo caso, cuando se adiciona un exceso de iones Pb(II) a Zn₇-MT2 (Fig. 86) se observó que el clúster inicial (Zn₇-MT2) desaparece y se forman nuevas especies homo y heterometálicas Pb_nZn_m-MT2, siendo la más abundante Pb₉-MT2, seguida de Pb₈Zn₁- y Pb₁₀-MT2. A partir de 1 hora, se da la siguiente relación Pb₉-, Pb₁₀- y Pb₈Zn₁-MT2 que se mantienen como las especies más abundantes y son estables hasta las 24 horas de reacción.

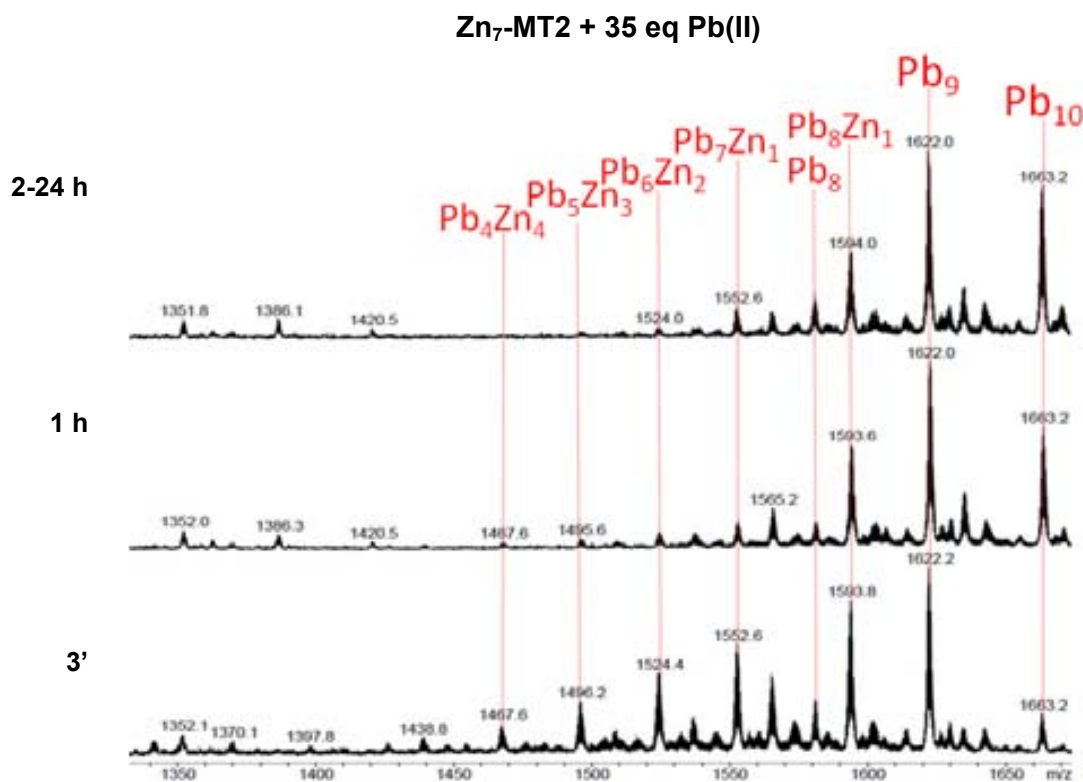


Figura 86. Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la evolución de una solución 10 μ M de Zn₇-MT2, a pH 7.0 y 25 °C, tras la adición de 35 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +5, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

También se realizó un experimento de una solución 10 μ M de Zn₇-MT2 que se llevó a cabo en condiciones fisiológicas, a pH 7.0 y 37 °C, en donde se añadieron 10 equivalentes de Pb(II) y la reacción se registró hasta las 8 h.

Los espectros de masas registrados (Fig. 87) revelan que la especie de partida Zn₇-MT2 mantiene su abundancia respecto al tiempo y se forman las siguientes especies: Pb₇Zn₁-MT2 es la mayoritaria, seguida por Pb₉-MT2, y menos abundantes son Pb₈Zn₁- y Pb₆Zn₂-MT2 y las correspondientes heterometálicas Pb_nZn_m-MT2. A partir de 1 hora el clúster Pb₁₀-MT2 pasa a ser el más abundante seguido de Pb₉- y Pb₈Zn₁-MT2 y también se observa una gran variedad de complejos, tanto homo- como heterometálicos Pb_nZn_m-MT2. A las 2 h comienza a disminuir en abundancia la especie Pb₁₀-MT2, mientras que las otras se mantienen estables, pero la especie Pb₇Zn₁-MT2 va aumentando su

abundancia. Tras las 8 horas de reacción las especies más abundantes son: Pb_7Zn_1^- , Pb_7Zn_2^- , Pb_8Zn_1^- , Pb_9^- y $\text{Pb}_6\text{Zn}_2\text{-MT}_2$.

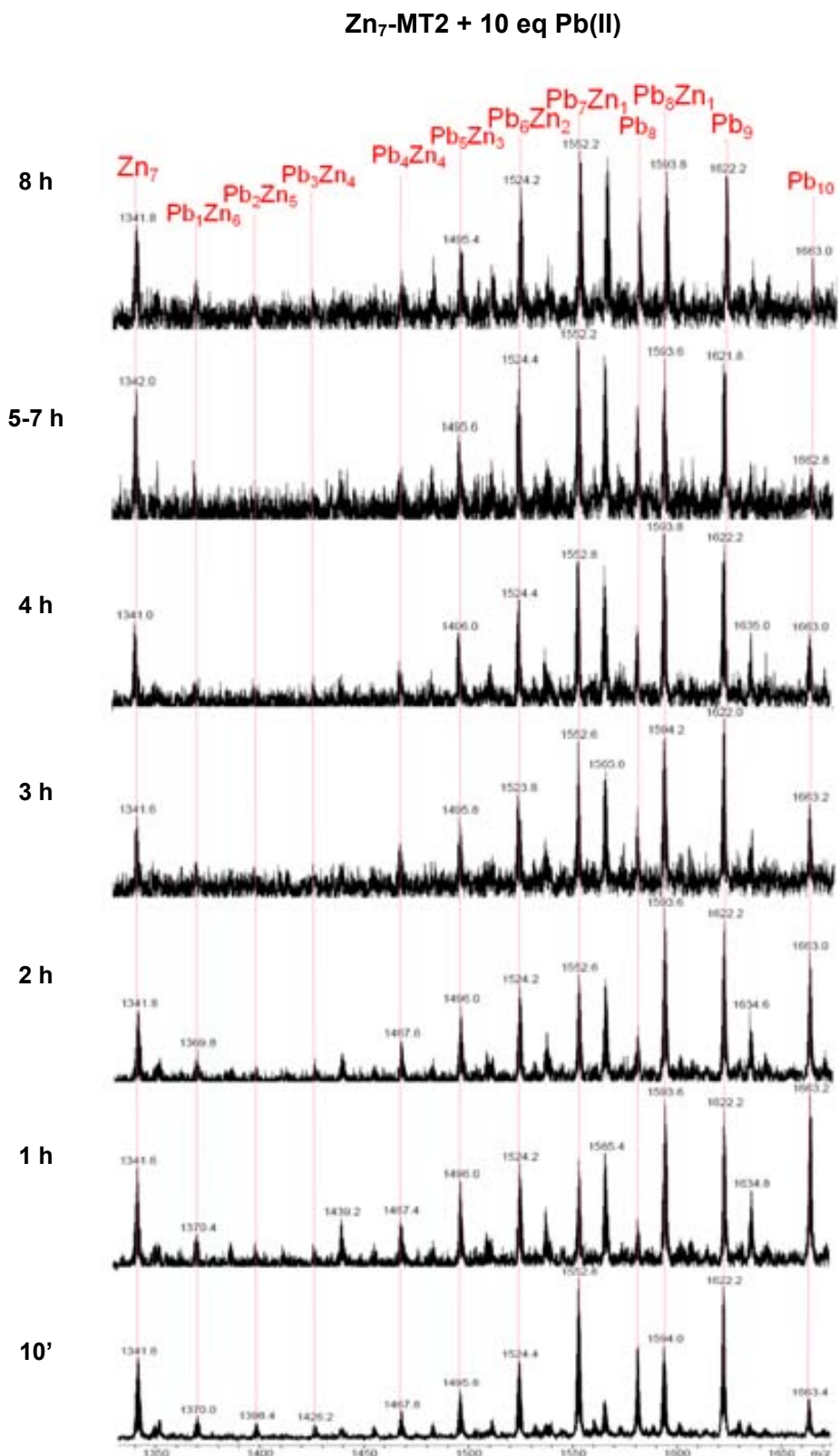


Figura 87. Espectros de ESI-MS registrados durante 8 horas que muestran la evolución de una solución 10 μM de Zn₇-MT₂, a pH 7.0 y 37 °C, tras la adición de 10 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado d e carga +5, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

La formación de las especies hasta con 10 iones Pb(II), como Pb₁₀-MT2, muestra una relación con la saturación de Zn₇-MT2 tras la adición del 10° eq de Pb(II) observada por las señales espectroscópicas de DC y UV-vis. Por su parte, estos espectros de masas revelan que la especie Pb₉-MT2 presenta una gran estabilidad y abundancia a lo largo de la reacción, en todas las condiciones ensayadas. Además, las especies heterometálicas Pb,Zn-MT2 más abundantes suman entre 8 y 9 iones, manteniendo coordinado principalmente entre 1 y 2 iones Zn(II).

2.2.1.3. Estudio por microcalorimetría, ITC

Con la finalidad de obtener datos termodinámicos referentes al desplazamiento de Zn(II) por Pb(II) al valorar Zn₇-MT2, se realizó un experimento mediante ITC, en condiciones análogas a las definidas para el estudio espectroscópico, es decir, concentración 10 μM de proteína, pH 4.5 y 37 °C.

Los resultados obtenidos de esta valoración por ITC (Fig. 88, Tabla 21), nos muestra que el desplazamiento de Zn(II) por Pb(II) se da en un proceso termodinámicamente favorable con un ΔG de -8179 cal/mol, así también esta favorecido tanto entrópico como entálpicamente, donde la diferencia de entropía (ΔS) es de 9.84 cal/molK indica que la formación de los nuevos clústeres de Pb(II) es favorable y presentan un mayor desorden molecular que los de Zn(II). Así también la diferencia de entalpía (ΔH) es -5136 cal/mol revela un proceso energéticamente favorable, es decir, una reacción exotérmica.

$K \times 10^{-5}$	ΔG (cal/mol)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/molK)	N (Eq de Pb(II))
5.89 ± 1.29	-8179	-5136 ± 121	9.84	13.3 ± 0.17

Tabla 21. Datos termodinámicos obtenidos a partir del experimento de ITC de la valoración de una solución 10 μM de Zn₇-MT2, a pH 4.5 y 37 °C, con Pb(II). El resultado de ΔG se ha obtenido a partir de la fórmula $\Delta G = -RT \ln K$.

El número de iones Pb(II) (N) que se coordinan a Zn₇-MT2 corresponden a aproximadamente 13, este resultado no coincide con la saturación observada en los experimentos espectroscópicos de DC y UV-vis en condiciones de pH 4.5, y no se relaciona con las especies observadas por ESI-MS. La diferencia puede deberse a que la curva experimental no se ajusta a la curva teórica, ya que al comienzo de la curva (Fig. 88) se observa otra pendiente que podría indicar que existe más de un sitio de coordinación y éstos no son idénticos. No obstante, este número de iones podría tener relación con el máximo de iones que puede coordinar esta proteína, ya que incluso para 12 eq de Pb(II) añadidos (en condiciones de pH 7.0) se observó en la gráfica abs. vs. eq de Pb(II) una pendiente (Fig. 80), revelando que Zn₇-MT2 no se satura totalmente.

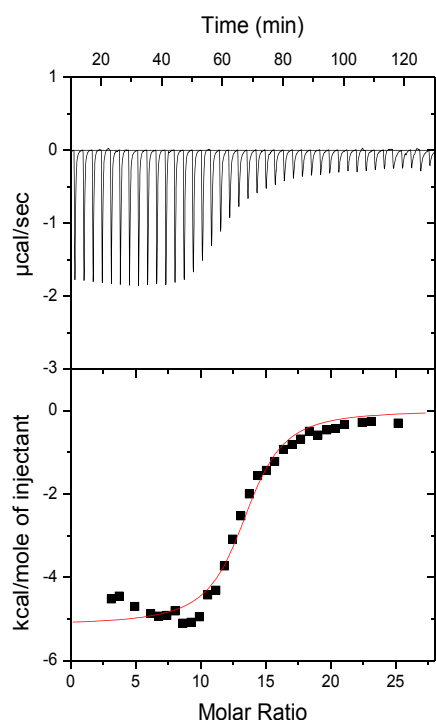


Figura 88. Termograma (arriba) y representación del calor desprendido (a bajo) frente a los equivalentes de Pb(II) añadidos a una solución 10 μ M de Zn₇-MT2 a pH 4.5 y 37 °C, de acuerdo con la metodología descrita en los apartados III y VI.2.

2.2.2. Dominio α MT2

2.2.2.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis

El presente estudio de la habilidad coordinante de Zn₄- α MT2 frente a Pb(II), se ha llevado a cabo mediante las valoraciones con Pb(II) seguidas por espectroscopía de DC y UV-vis. De acuerdo con los datos recogidos en el estudio de Zn₇-MT2 con Pb(II), se evidencia que las valoraciones a pH 4.5 y 7.0 no muestran un patrón del todo similar. Es por esto que se ha decidido estudiar los dos fragmentos (α - y β MT2) sólo a pH neutro, en las siguientes condiciones experimentales:

Concentración (μ M)	Temperatura (°C)	pH
20	25	7.0
	55	

Tabla 22. Condiciones experimentales de las valoraciones de Zn₄- α MT2 con Pb(II) para el estudio espectroscópico de DC y UV-vis.

Así la valoración en las condiciones estándar de trabajo corresponde a una solución de concentración 20 μ M de Zn₄- α MT2, a pH 7.0 y 25 °C, que será el primer análisis. Luego se comparará con los resultados obtenidos a 55 °C.

El análisis de los datos espectroscópicos de la valoración con Pb(II) de Zn₄- α MT2 en las condiciones estándar, ha revelado la coordinación de los iones Pb(II) a este dominio, observándose la aparición de nuevas absorciones diferentes a la inicial, tanto en los espectros de DC como en los de UV-vis (Fig. 89, Tabla 23).

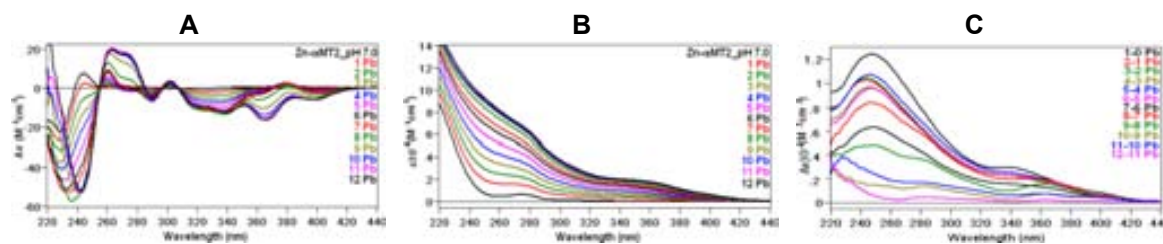


Figura 89. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT}_2$ a pH 7.0 y 25 $^\circ\text{C}$ hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Eq de Pb(II)	DC	UV-vis	dif. UV-vis
1 $^\circ$	228(-), 245(+), 260(+), 288(-), 303, 340(-), 380(+), 401(-) nm	260, 350 nm	250, 350 nm
2 $^\circ$ -7 $^\circ$	260(+), 288(-), 303(+), 340(-), 380(+), 401(-) nm		
8 $^\circ$ -12 $^\circ$	243(-), 262(+)-275(+), 290(-), 303(+), 340(-)-366(-)-400(-) nm		

Tabla 23. Absorciones correspondientes a los espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis de la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT}_2$ a pH 7.0 y 25 $^\circ\text{C}$ hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 90) muestran una serie de absorciones que aparecen a medida que se adicionan los iones Pb(II) mostrando más de una etapa, donde aumentan, desaparecen y se desplazan estas señales.

Se observó que al adicionar el 1 $^\circ$ eq de Pb(II) la señal inicial del cromóforo Zn(II)-Cys centrada a 240(+) nm va disminuyendo su intensidad mostrándose negativa hasta desaparecer y mientras tanto, surge una nueva absorción centrada a 260(+) nm. En esta evolución se observa un punto isodicroico a 250 nm.

La primera etapa comprende desde el 1 $^\circ$ hasta el 6 $^\circ$ eq de Pb(II) , y la segunda etapa a partir del 7 $^\circ$ hasta el 10 $^\circ$ eq de Pb(II) añadido, y al adicionar el 8 $^\circ$ eq de Pb(II) algunas señales pierden intensidad entre el rango de 350 y 440 nm, mientras que otras siguen evolucionando entre 250 y 290 nm, hasta saturarse definitivamente para el 10 $^\circ$ eq de Pb(II) .

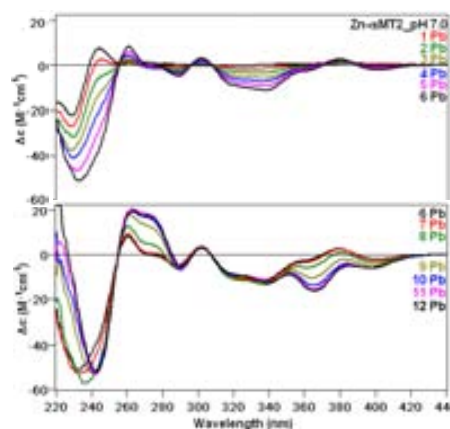


Figura 90. Evolución de los espectros de DC de la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT}_2$ a pH 7.0 y 25 $^\circ\text{C}$ con 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de UV-vis (Fig. 89B) muestran dos absorciones a 260 y 350 nm, además inicialmente se observa una leve absorción a 280 nm que va aumentando y finalmente parece como un hombro de la señal más ancha a 260 nm. Estas

absorciones se saturan en una primera etapa a partir del 6° eq de Pb(II) y una saturación total para el 10° eq de Pb(II). En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 91) se observan las absorciones de *tipo II*, desde el 1° hasta el 8° eq de Pb(II) añadido y tras adiciones posteriores aparecen otras señales.

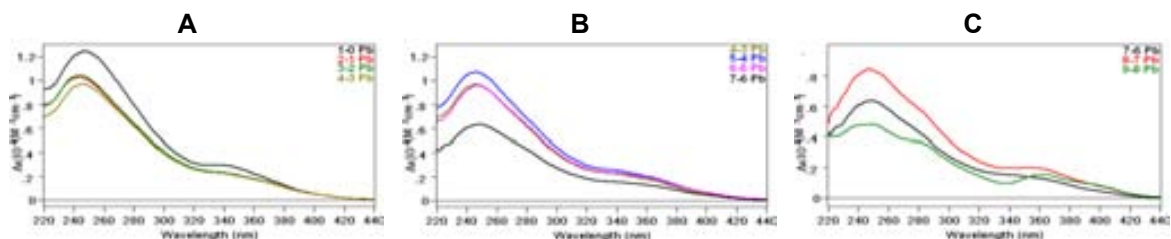


Figura 91. Evolución de los espectros de dif. UV-vis del (A) 1°-4°, (B) 4°-7° y (C) 7°-9° eq de Pb(II) de la valoración de una solución 20 μ M de Zn₄- α MT2 a pH 7.0 y 25 °C con máx. t_{est} .

En la gráfica de absorbancia en función de los iones Pb(II) añadidos a Zn₄- α MT2 se puede observar la saturación a partir del 10° eq de Pb(II).

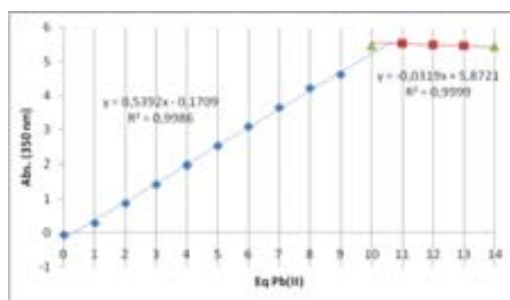


Figura 92. Gráficas absorbancia 350 nm vs. eq de Pb(II) de la valoración de una solución 20 μ M de Zn₄- α MT2 con Pb(II) a pH 7.0 y a 25 °C concediendo máx. t_{est}

Por su parte, la adición de Pb(II) a Zn₄- α MT2 a una temperatura más elevada, 55 °C, provocó la aparición de nuevas absorciones en los espectros de DC y UV-vis (Fig. 93), revelando la coordinación de Pb(II) a este dominio.

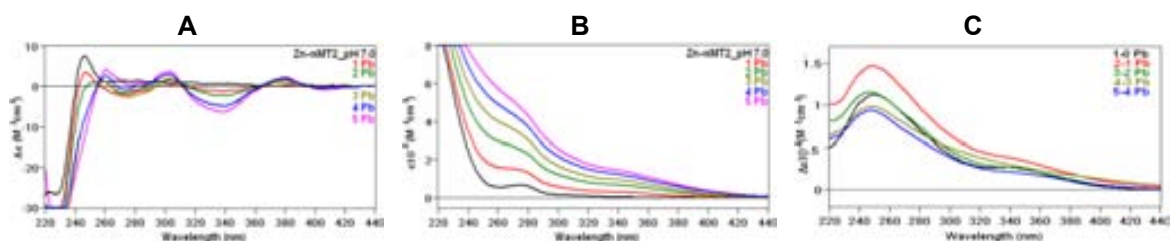


Figura 93. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μ M de Zn₄- α MT2 a pH 7.0 y 55 °C hasta 5 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

La valoración en estas condiciones reveló una rápida estructuración de Zn₄- α MT2 frente a Pb(II) mostrando una huella espectral de DC semejante a la observada en la

valoración de Zn_7 -MT2 con $Pb(II)$ a temperatura ambiente. Así como en Zn_7 -MT2, la adición del 5° eq de $Pb(II)$ provocó la formación de precipitado, pero éste no afectó la intensidad de las señales espectroscópicas. En los espectros de DC (Fig. 93A) se observa un grupo de absorciones a 228(-), 247(+), 261(+), 275(-), 303(+), 338(-), 380(+) y 405(-) con un proceso isodicroico de cinco puntos a 256, 293, 310, 365 y 395 nm. La absorción inicial 240(+) nm disminuye su intensidad a medida que se añaden los iones $Pb(II)$.

En los espectros de UV-vis (Fig. 93B) se observan las absorciones a 280 nm presente desde el inicio de la valoración (que podrían ser sulfuros, pero esto se descartó con los datos de ICP) y otra a 350 nm que aparece por la formación del enlace Pb - α MT2. Los espectros de dif. UV-vis (Fig. 93C) muestran sólo absorciones de *tipo II*. La saturación de las señales espectroscópicas se observa entre el 4° y 5° eq de $Pb(II)$.

Así el conjunto de resultados espectroscópicos obtenidos en estas valoraciones, nos indican que tras la adición de $Pb(II)$ a Zn_4 - α MT2, estos iones se coordinan a este dominio en condiciones de pH neutro. Además, se observó un efecto de la temperatura en la saturación de las señales, siendo a 25 °C para 10° eq de $Pb(II)$ y a 55 °C para 5° eq de $Pb(II)$. Esto podría revelar que los clústeres Pb - α MT2 formados a mayor temperatura presentan una estructura más compacta y estable dentro de la proteína impidiendo la entrada de más iones $Pb(II)$, mostrando algunas diferencias en las absorciones, como se puede ver en la Fig. 94. A su vez, el aumento de temperatura provocó que los t_{est} por equivalentes de $Pb(II)$ añadidos a este dominio sean más cortos.

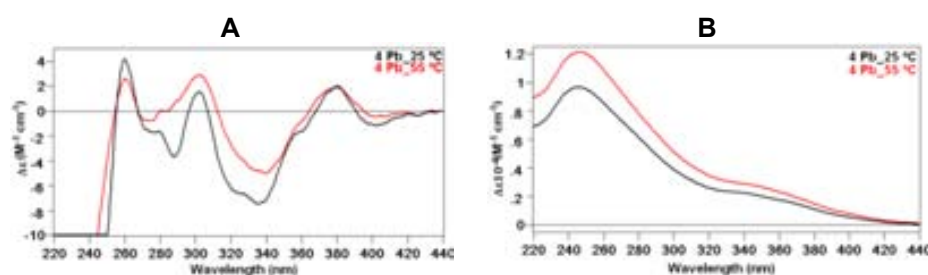


Figura 94. Comparación de los espectros de (A) DC y (B) dif. UV-vis del 4° eq de $Pb(II)$ añadido en la valoración de una solución 20 μ M de Zn_4 - α MT2 a pH 7.0, a 25 y 55 °C, con máx. t_{est} .

2.2.2.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS

Los experimentos realizados mediante ESI-MS se llevaron a cabo siguiendo dos metodologías: una, añadiendo la misma cantidad de $Pb(II)$ que el contenido de $Zn(II)$ inicial en el dominio Zn_4 - α MT2, es decir, 4 eq de $Pb(II)$; y la otra añadiendo un exceso de 16 iones $Pb(II)$, cada adición a las correspondientes soluciones 20 μ M de Zn_4 - α MT2

a 25 °C y pH 7.0. Estas muestras fueron analizadas a lo largo de 12 horas con el fin de observar la evolución de las especies formadas.

El análisis de los resultados obtenidos en estas condiciones muestra que la adición de 4 eq de Pb(II) a la solución proteica da lugar a la formación de especies de Pb(II), tanto homometálicas como heterometálicas Pb,Zn- α MT2, como se puede observar en la Fig. 95.

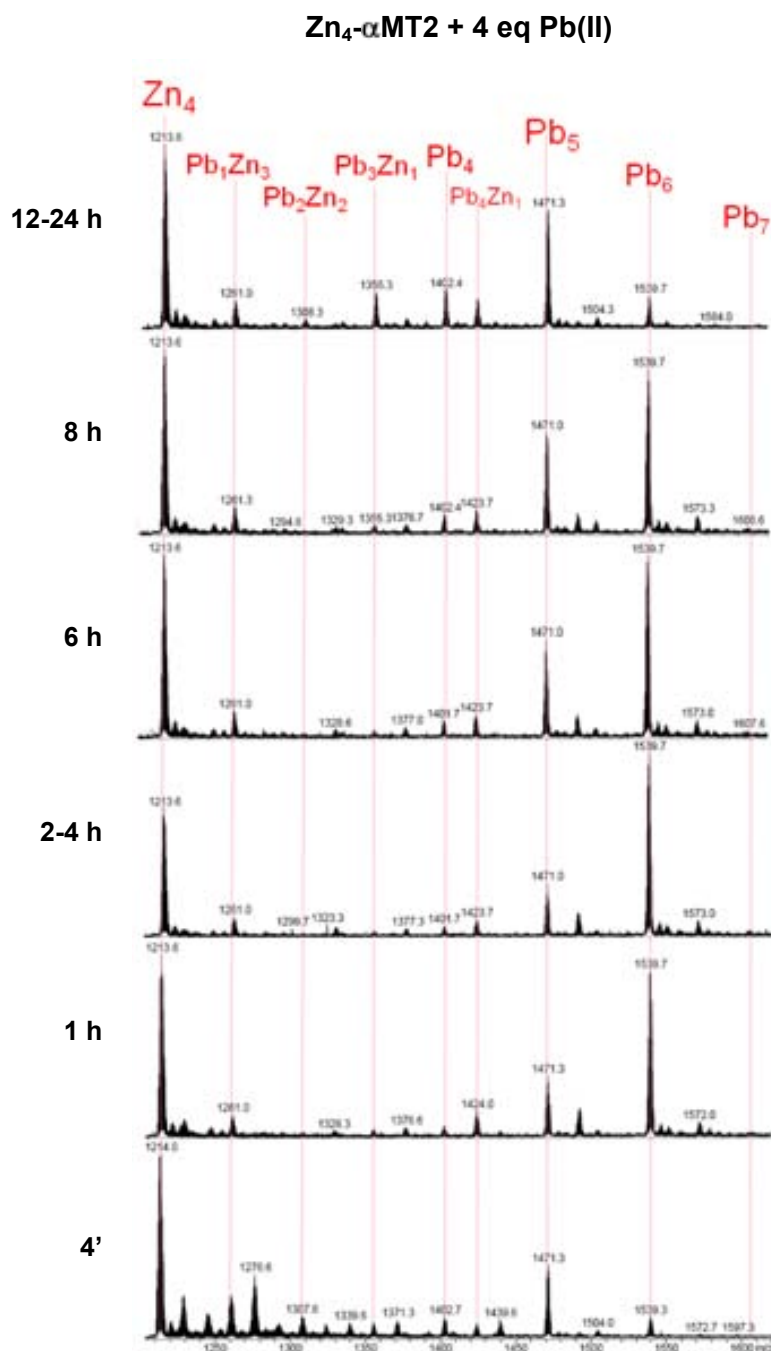


Figura 95. Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la evolución de una solución 20 μ M de Zn₄- α MT2, a pH 7.0 y 25 °C, tras la adición de 4 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +3, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

En un principio (4 min) se observa la especie inicial $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT2}$ con gran abundancia y la aparición de otros picos minoritarios de complejos de Pb(II), como son: $Pb_5\text{-}$, $Pb_1Zn_3\text{-}$ y $Pb_6\text{-}\alpha\text{MT2}$.

Al cabo de 1 hora, el clúster $Pb_6\text{-}\alpha\text{MT2}$ iguala su abundancia a la $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT2}$ siendo ambas las mayoritarias y $Pb_5\text{-}\alpha\text{MT2}$ se mantiene. Entre las 2 y 4 horas de reacción la especie más abundante es $Pb_6\text{-}$ seguida de $Zn_4\text{-}$ y $Pb_5\text{-}\alpha\text{MT2}$. Al cabo de 6 horas, los picos más abundantes de $Pb_6\text{-}$ y $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT2}$ son similares y la especie $Pb_5\text{-}$ comienza aumentar su abundancia, mientras la señal de la especie $Pb_6\text{-}\alpha\text{MT2}$ empieza a disminuir en intensidad. Tras 12 horas, el espectro de masas muestra que el clúster inicial $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT2}$ es el más abundante y siguen presentes las especies homometálicas $Pb_5\text{-}$ y en mucho menor abundancia $Pb_6\text{-}\alpha\text{MT2}$.

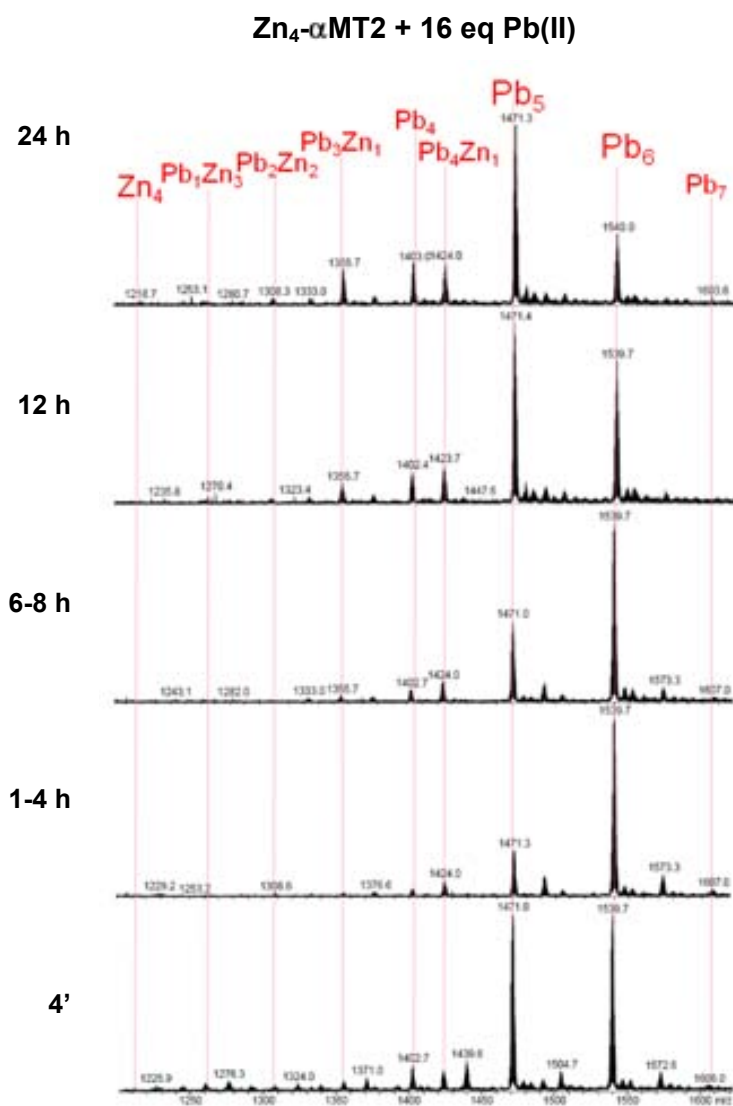


Figura 96. Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la evolución de una solución 20 μM de $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT2}$, a pH 7.0 y 25 $^{\circ}\text{C}$, tras la adición de 16 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +3, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

En el segundo experimento, los espectros de masas registrados (Fig. 96) revelan que la adición de un exceso de 16 eq de Pb(II) a la proteína Zn₄- α MT2, provoca la formación de especies tanto homo- como heterometálicas Pb,Zn- α MT2 y la especie inicial Zn₄- α MT2 desaparece a lo largo de la reacción. Las especies más abundantes son Pb₅- y Pb₆- α MT2, y aparecen otras de abundancia mínima como son Pb₃Zn₁-, Pb₄-, Pb₄Zn₁- α MT2. Al cabo de 1 hora, la especie Pb₆- α MT2 es la más abundante seguida de Pb₅- y éstas se mantienen hasta las 8 horas. Tras 12 horas, el clúster más abundante es Pb₅- α MT2 seguido del pico Pb₆- α MT2 que comienza a disminuir en intensidad. A las 24 horas, el espectro de masas muestra como única especie mayoritaria a Pb₅- α MT2 y se observan en menor abundancia otras como Pb₆-, Pb₄-, Pb₃Zn₁- y Pb₄Zn₁- α MT2.

Los resultados obtenidos por ESI-MS en ambos experimentos muestran que las especies de Pb(II) más importantes formadas son Pb₅- y Pb₆- α MT2, que se puede relacionar con la saturación parcial de las señales espectroscópicas de DC y UV-vis. La principal diferencia provocada por la cantidad de Pb(II) añadida, es la desaparición de la especie inicial Zn₄- α MT2 en exceso de plomo(II). En ambas condiciones se forman especies heterometálicas Pb,Zn- α MT2 que coordinan un total de 4 o 5 iones entre Zn(II) y Pb(II) y las homometálicas coordinan como máximo 6 iones Pb(II).

2.2.3. Dominio β MT2

2.2.3.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis

El presente estudio de la habilidad coordinante de Zn₃- β MT2 frente a Pb(II), se ha llevado a cabo mediante valoraciones con Pb(II) en diferentes condiciones experimentales (Tabla 24) registradas por espectroscopía de DC y UV-vis.

Concentración (μ M)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	pH
20	25	7.0
	37	
	55	

Tabla 24. Condiciones experimentales de las valoraciones de Zn₃- β MT2 con Pb(II) para el estudio espectroscópico de DC y UV-vis.

Así como se puede observar en la tabla anterior, las condiciones estándar de trabajo son: una solución 20 μ M de Zn₃- β MT2, a pH 7.0 y 25 $^{\circ}$ C, que será el primer análisis. Luego se comparará con los resultados de la variación de temperatura, a 37 $^{\circ}$ C y 55 $^{\circ}$ C.

El análisis de la valoración de la solución de Zn₃- β MT2 con Pb(II) en condiciones estándar (Fig. 97, Tabla 25), revela la coordinación de Pb(II) a este dominio

provocando la aparición de absorciones similares a las observadas en los espectros de DC y UV-vis de Zn₇-MT2 en presencia de Pb(II).

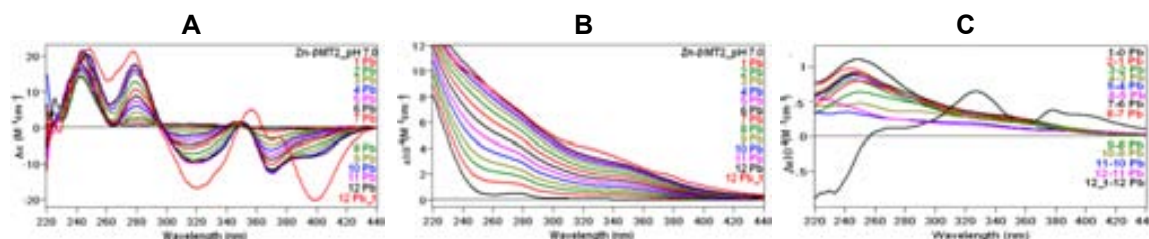


Figura 97. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μM de Zn₃- β MT2 a pH 7.0 y 25 °C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Eq de Pb(II)	DC	UV-vis	dif. UV-vis
1°-12°	240(+) y 280(+); 310(-) ancha; 345(+), 400(-) ancha nm	260, 350 nm	250, 350 nm
12° _t	245-276(+); 322(-), 360-376(+), 403(-) nm	260, 330, 380 nm	260, 330, 380, 400 nm

Tabla 25. Absorciones correspondientes a los espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis de la valoración de una solución 20 μM de Zn₃- β MT2 a pH 7.0 y 25 °C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 97A) muestran una evolución espectral desde el 1° hasta el 8° eq de Pb(II), por medio de tres puntos isodicroicos: 295, 337 y 350 nm. A partir del 9° eq de Pb(II) hay un leve desplazamiento a 260(+) nm y aparece un pequeño hombro alrededor de 400(-) nm.

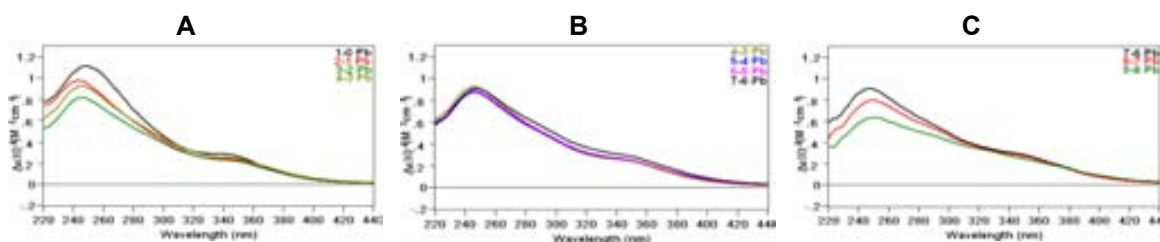


Figura 98. Espectros de dif. UV-vis del (A) 1°-4°, (B) 4°-7° y (C) 7°-9° eq de Pb(II) añadidos en la valoración de una solución 20 μM de Zn₃- β MT2 a pH 7.0 y 25 °C.

En los espectros de UV-vis (Fig. 97B) aparecen dos absorciones una a 260 y otra a 350 nm, asignadas como las de *tipo II*. Por su parte en los espectros de dif. UV-vis (Fig. 98) se observan que estas señales aparecen visiblemente desde el 1° hasta el 8° eq de Pb(II), pero se saturan para el 4° de Pb(II). La saturación de las señales espectroscópicas de DC y UV-vis se da a partir del 10° eq de Pb(II) añadido a Zn₃- β MT2.

En esta valoración tras adicionar el 12° eq de Pb(II) y registrar los espectros, se dejó un t_{est} de 20 horas (1 noche) y se volvieron a medir. Este mayor tiempo de estabilización

provocó la aparición de nuevas absorciones análogas a las de Zn₇-MT2 a 37 °C en presencia de Pb(II) (Fig. 99A), revelando una mayor estructuración de este fragmento frente a Pb(II). Esto conlleva a deducir que la reacción a temperatura ambiente es demasiado lenta y hacen falta t_{est} mucho mayores por equivalentes de plomo(II). Es por esto que se ha decidido estudiar la coordinación de Pb(II) a temperaturas más elevadas como a 37 y 55 °C.

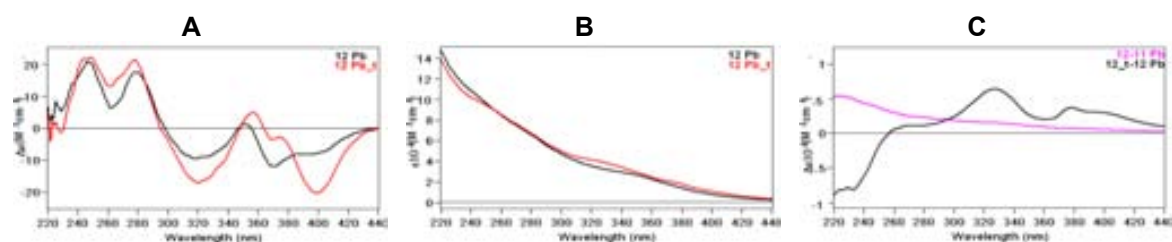


Figura 99. Evolución de los espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis del 12° eq de Pb(II) añadido con máx. t_{est} en la valoración de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT2 a pH 7.0 y 25 °C.

En la valoración con Pb(II) de Zn₃- β MT2 a pH 7.0 y 37 °C, los iones provocan la aparición de nuevas absorciones en los espectros de DC y UV-vis (Fig. 100), que evolucionan a medida que se van incorporando los equivalentes de Pb(II). La saturación de las señales espectroscópicas se da a partir del 10° eq de Pb(II) añadido a este dominio.

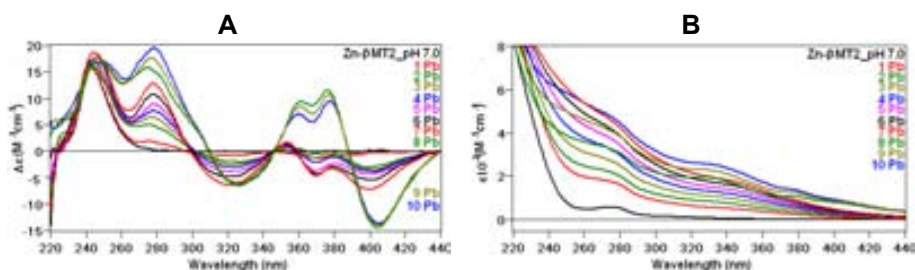


Figura 100. Espectros de (A) DC y (B) UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT2 a pH 7.0 y 37 °C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 100A) reflejan un proceso isodicroico desde el 1° hasta el 7° eq de Pb(II), pero a partir de la adición del 8° eq de Pb(II) las señales se desplazan y se hacen más intensas. En los espectros de UV-vis (Fig. 100B) se observa la aparición de nuevas absorciones cuando se satura la proteína. Así también, en los espectros de dif. UV-vis (Fig. 101) se puede ver que la contribución por equivalente de Pb(II) muestra distintas absorciones, en donde para el 1° y 3° eq de Pb(II) se observan señales de *tipo II*, en cambio para el 2° y 4° eq de Pb(II) se asemejan más a las cuatro absorciones de *tipo I*.

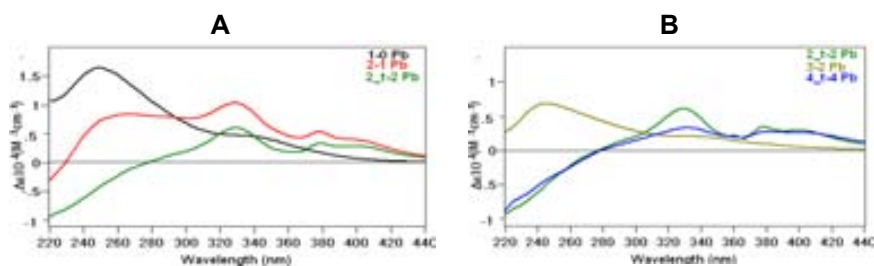


Figura 101. Espectros de dif. UV-vis de I (A) 1° al 2° y (B) del 2° hasta el 4° eq de Pb (II) añadidos en la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT2}$ a pH 7.0 y 37 °C con máx. t_{est} .

En la Fig. 102, se puede observar que al dejar un mayor t_{est} por eq de Pb(II) añadido a $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT2}$, hay una variación en las señales, tal y como se puede ver para el 2° y el 8° eq de Pb(II) en los espectros de DC. Esto revela que la proteína requiere un mayor tiempo de estabilización al incorporar los iones Pb(II), para así alcanzar una estructuración más compacta de la proteína frente a este metal. Debido a esto se decide seguir aumentando la temperatura de la valoración para llegar a una máxima estructuración de las especies Pb- βMT2 formadas.

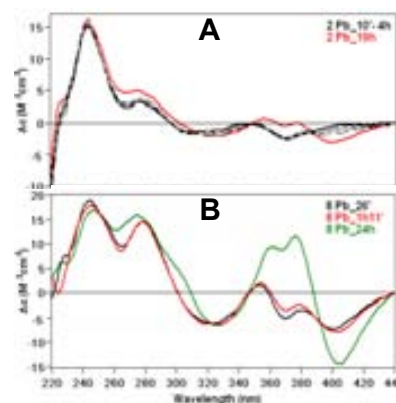


Figura 102. Evolución de los espectros de DC (A) del 2° eq de Pb(II) y (B) del 8° eq de Pb(II) añadidos en la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT2}$ a pH 7.0 y 37 °C.

En la valoración con Pb(II) de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT2}$ a 55 °C se observó que el aumento de la temperatura tiene un efecto en la estructuración de la proteína, provocando la aparición de absorciones más intensas con todos los máximos y mínimos (Fig. 103), mostrando una estructuración análoga a como lo hace $\text{Zn}_7\text{-MT2}$ en presencia de Pb(II), debido a que la incorporación de cada ión Pb(II) es más rápida y los agregados Pb-MT2 formados son más estables.

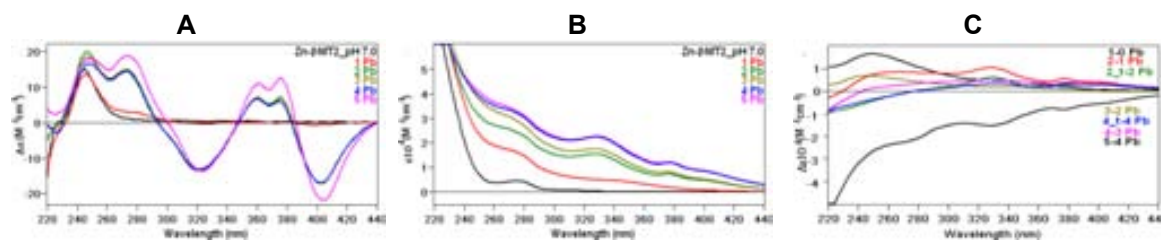


Figura 103. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT2}$ a pH 7.0 y 55 °C con 5 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Así como en las valoraciones con Pb(II) de Zn₄- α MT2 y de Zn₇-MT2 a 55 °C, en este fragmento también se observó la formación de precipitado (aparición de pelusas amarillas) en la solución a partir de la adición del 5° eq de Pb(II). Este precipitado afecta la intensidad en las señales de DC y UV-vis que se saturan al añadir el 2° y el 4° eq de Pb(II), respectivamente. Para mostrar claramente el efecto de este precipitado en los espectros de DC, se registraron; uno en presencia de precipitado y otro una vez agitada la solución, para así observar la variación en la intensidad de las señales, tal como se puede ver en la Fig. 104.

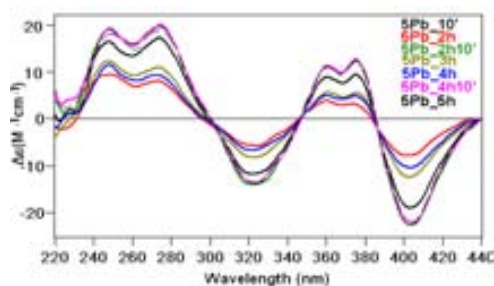


Figura 104. Espectros de DC del 5° eq de Pb(II) añadido en la valoración de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT2 a pH 7.0 y 55 °C. (5Pb_2h con pp y luego se agitó registrando 5Pb_2h10'; otro ejemplo es 5Pb_4h registrado con pp y se agitó para 5Pb_4h10').

Una vez analizados los datos espectroscópicos se puede decir que la temperatura tiene un efecto directo en la estabilización de los iones Pb(II) en la proteína, por lo que a mayor temperatura disminuye el t_{est} de cada ión Pb(II) incorporado a este dominio y la coordinación es más rápida, permitiendo una mayor estabilidad de los agregados Pb- β MT2, por tanto una mayor estructuración de estos clústeres en la proteína, que reflejan absorciones definidas e intensas similares a las observadas en Zn₇-MT2 en presencia de Pb(II). Por lo que la variación de temperatura afecta a la evolución espectral y la saturación de las señales espectroscópicas de DC y UV-vis.

En la Fig. 105, se puede observar la diferencia en las absorciones de los espectros de DC más intensos de cada valoración, a tres temperaturas diferentes; 25, 37 y 55 °C.

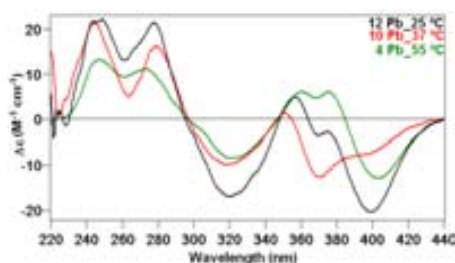


Figura 105. Comparación de espectros de DC del 12°, 10° y 5° eq de Pb(II) de las valoraciones de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT2, a pH 7.0 y 25, 37 y 55 °C, respectivamente.

Los resultados espectroscópicos obtenidos en las valoraciones realizadas nos indican que tras la adición de Pb(II) a Zn₃- β MT2 estos iones se coordinan a este dominio a pH 7.0 y dependen directamente de la temperatura.

2.2.3.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS

Los experimentos realizados mediante ESI-MS se llevaron a cabo siguiendo dos metodologías: la primera añadiendo la misma cantidad de Pb(II) que el contenido de Zn(II) inicial, o sea, 3 iones Pb(II); y la segunda añadiendo un gran exceso de 12 equivalentes de Pb(II), cada una a las correspondientes preparaciones de solución 20 μM de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT2}$ a 25 $^\circ\text{C}$ y pH 7.0. Estas muestras fueron analizadas a lo largo de 12 horas con el fin de observar la evolución de las especies formadas.

El análisis de los resultados obtenidos tras la adición de 3 iones Pb(II) a la solución proteica en estas condiciones nos muestra la formación de especies tanto homometálicas Pb- βMT2 como heterometálicas Pb,Zn- βMT2 (Fig. 106), donde se ha podido observar que la especie más abundante es $\text{Pb}_4\text{-}\beta\text{MT2}$, seguida de la inicial $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT2}$ y se distinguen en menor abundancia los complejos $\text{Pb}_3\text{Zn}_1\text{-}$ y $\text{Pb}_5\text{-}\beta\text{MT2}$. A medida que pasa el tiempo, la especie $\text{Pb}_4\text{-}\beta\text{MT2}$ se mantiene como la más abundante y la especie $\text{Zn}_3\text{-}$ disminuye. Tras 24 horas las especies $\text{Zn}_3\text{-}$ y $\text{Pb}_4\text{-}\beta\text{MT2}$ son las más abundantes y las otras especies heterometálicas Pb,Zn son minoritarias.

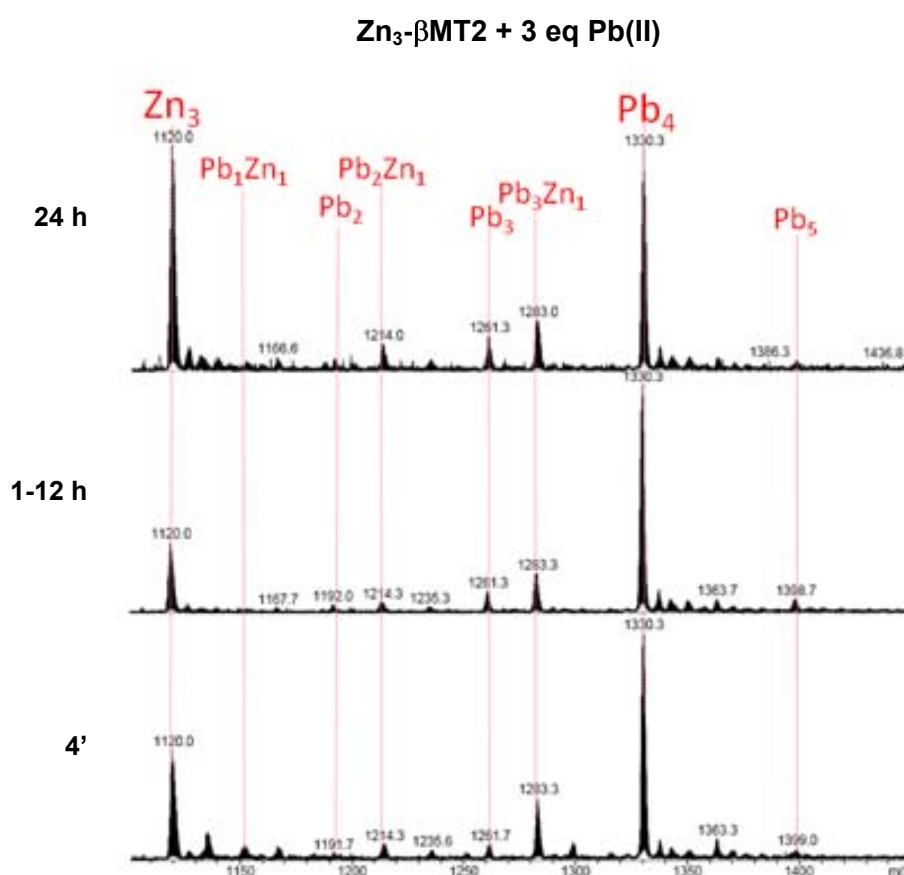


Figura 106. Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la evolución de una solución 20 μM de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT2}$, a pH 7.0 y 25 $^\circ\text{C}$, tras la adición de 3 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +3, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

En el segundo experimento al añadir 12 eq de Pb(II), los espectros de masa registrados muestran la formación de especies homo y heterometálicas Pb,Zn- β MT2 (Fig. 107). En un primer momento se observó una única especie mayoritaria homometálica, Pb₄- β MT2, y luego con mucho menor abundancia Pb₅- y la heterometálica Pb₃Zn₁- β MT2. Estas especies se mantienen estables durante las 24 horas de reacción y no hay formación de la especie inicial Zn₃- β MT2.

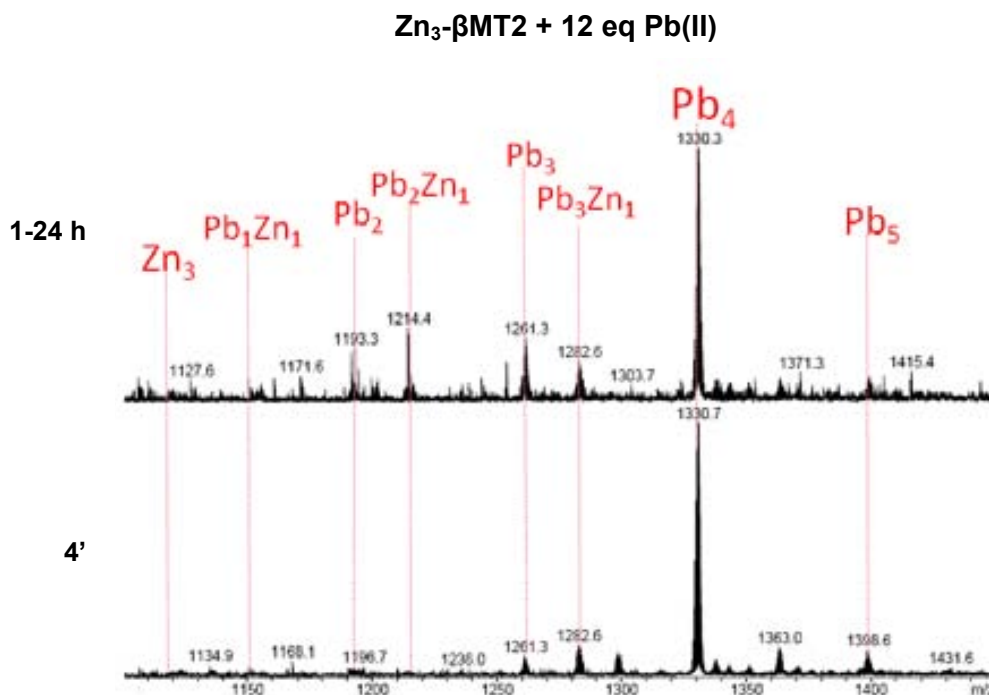


Figura 107. Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la evolución de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT2, a pH 7.0 y 25 °C, tras la adición de 12 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +3, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

Los resultados obtenidos por ESI-MS en ambos experimentos muestran que la especie más abundante es Pb₄- β MT2, que se puede relacionar con la saturación de las señales tras el 4° eq de Pb(II) añadido observada en los espectros de dif. UV-vis, en similares condiciones experimentales, y también en el DC y UV-vis a 55 °C.

La principal diferencia provocada por el número de iones Pb(II) añadidos es la formación de la especie inicial Zn₃- β MT2, que es nula en presencia de exceso de plomo. En ambas condiciones se forman especies heterometálicas Pb,Zn- β MT2 que coordinan un total de 3 o 4 iones entre Zn(II) y Pb(II) y las homometálicas coordinan como máximo 5 iones Pb(II).

2.2.4. Análisis global del estudio de la habilidad coordinante de la isoforma MT2 y sus dominios α y β frente a Pb(II)

A partir de los resultados obtenidos en el estudio de la habilidad coordinante de Zn-MT2 y sus dominios Zn- α MT2 y Zn- β MT2, por espectroscopía de DC y UV-vis, espectrometría de masas y por ITC (sólo para Zn-MT2), podemos señalar que:

El estudio de la habilidad coordinante de la isoforma MT2 frente a Pb(II) ha mostrado que esta proteína coordina los iones Pb(II) estructurándose de manera análoga como lo hace MT1 en presencia de Pb(II), siguiendo procesos isodicroicos, indicando que probablemente los clústeres Pb-MT se forman de manera cooperativa, o sea, que hay una evolución del agregado inicial al final sin formación de especies intermedias.

La saturación de Zn₇-MT2 se da a partir del 6° y 10° eq de Pb(II) añadido, a pH 4.5 y a 7.0, respectivamente. Las absorciones que aparecen por consecuencia de la contribución de cada equivalente de Pb(II) añadido a Zn₇-MT2 dependen del pH, a 4.5 sólo se observan de “*tipo I*”, indicando que hay un sólo sitio de unión a Pb(II). En cambio a pH 7.0, para los 4 primeros equivalentes Pb(II) se observaron principalmente las absorciones de “*tipo II*”, semejantes a las observadas en la coordinación de Pb(II) a proteínas de zinc por medio de tres Cys con una geometría piramidal trigonal. Además se observan otras bandas similares a las de *tipo I*, que revelan otro sitio de unión de los iones Pb(II) en Zn₇-MT2.

Esto se corroboró con lo observado por ITC que revela dos procesos de unión de Pb(II) en la proteína, con una media estequiométrica de 13 iones Pb(II).

Adicionalmente, los espectros de masas muestran la formación de especies homo y heterometálicas de Pb(II) y Zn(II), la especie más importante es Pb₉-MT2 y se observa que la proteína es capaz de unir hasta 10 iones Pb(II) y formar clústeres mixtos entre 7 y 9 iones, desde la especie Pb₁Zn₇- hasta Pb₈Zn₁-MT2, esto revela que el Pb(II) se une en otros sitios de unión dentro de la proteína.

Por su parte, el estudio de la habilidad coordinante de Zn₄- α MT2 frente a Pb(II) reveló que los iones plomo se enlazan a este dominio, mostrando una huella espectral de DC diferente a la observada en Zn₇-MT2 en presencia de Pb(II), en donde desaparece la señal inicial Zn₄-SCys y se forman nuevas bandas. Las señales espectroscópicas muestran una saturación parcial de la proteína para el 6° eq de Pb(II) y otra total tras la adición del 10° eq de Pb(II) añadido. La formación del enlace Pb- α MT2 reveló absorciones de *tipo II*. En este dominio la reacción de intercambio metálico es lenta, por lo que el aumento de la temperatura provocó la disminución de los t_{est} de los iones Pb(II) y una saturación total de Zn₄- α MT2 para el 5° eq de Pb(II) añadido a 55 °C.

En los espectros de masas se observan que los clústeres más importantes que se forman son Pb_5- y $Pb_6-\alpha$ MT2, reflejando que la proteína es capaz de unir entre 1 y 2 iones más de los inicialmente coordinados a $Zn_4-\alpha$ MT2, indicando que estos nuevos agregados de Pb(II) formados tienen sitios de unión diferentes a los iones Zn(II) provocando una nueva estructuración de este dominio.

En el caso del estudio de $Zn_3-\beta$ MT2 frente a Pb(II), este reveló la coordinación de los iones Pb(II) a este dominio, provocando la aparición de nuevas absorciones análogas a las observadas en Zn_7 -MT2 tras el azar plomo, siguiendo un proceso parcialmente isodicroico. Las señales espectroscópicas muestran una saturación de este dominio para el 10° eq de Pb(II) añadido a 25 °C, y a 55 °C una parcial para el 2° y una total para el 4° eq de Pb(II). A temperatura ambiente la reacción de intercambio de Zn(II) por Pb(II) es lenta y el aumento de ésta hace disminuir los t_{est} de los iones Pb(II), provocando una pronta saturación de $Zn_3-\beta$ MT2.

Los nuevos enlaces Pb- β MT2 originan la aparición de absorciones de *tipo II* a 25 °C, que podría indicar un sólo sitio de unión a Pb(II) por medio de tres Cys en una geometría piramidal trigonal y en cambio a 37 y 55 °C, las bandas son de *tipo I y II*, revelando más de un entorno de coordinación.

Por espectrometría de masas se observó que la especie más importante es $Pb_4-\beta$ MT2, indicando así que este fragmento aumenta el número de iones coordinados inicialmente a $Zn_3-\beta$ MT2, mostrando una nueva estructuración de la proteína frente a estos iones.

Finalmente, el estudio de la habilidad coordinante de la isoforma MT2 de mamífero y sus dominios α y β frente a Pb(II) muestran que los fragmentos se comportan de manera independiente dentro de la proteína entera, de acuerdo a la capacidad coordinante de los iones plomo(II), ya que los clústeres formados más importantes son $Pb_5-\alpha$ MT2 y $Pb_4-\beta$ MT2 y en la proteína entera es Pb_9 -MT2. De acuerdo a la estructuración frente a los iones Pb(II), el fragmento β MT2 presenta absorciones semejantes a MT2, reflejando un plegamiento análogo en presencia de Pb(II). Además al comparar las reacciones de incorporación de Pb(II), se pudo observar que en α MT2 es más lenta que para β MT2, indicando así que este último fragmento tiene una mayor habilidad coordinante, ya que sus especies Pb- β MT2 se mantienen estables en el tiempo y presentan una mayor estructuración que las Pb- α MT2. Por lo que el fragmento β MT2 sería el dominante dentro de la proteína entera Zn-MT2, reflejando esta gran capacidad coordinante frente a Pb(II).

2.3. Habilidad coordinante de la isoforma MT3 de mamífero y sus dominios α y β frente a Pb(II)

2.3.1. Isoforma MT3 de mamífero

2.3.1.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis

En este apartado se analizarán y discutirán los resultados obtenidos en las valoraciones de la preparación Zn-MT3 con Pb(II) mediante DC y UV-vis en diferentes condiciones experimentales que se muestran a continuación:

Concentración (μM)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH
5	37	7.0
	55	4.5
10	25	4.5 7.0
	55	
	37	7.0
20	55	4.5
	37	7.0

Tabla 26. Condiciones experimentales de las valoraciones de la preparación Zn-MT3 con Pb(II) para el estudio espectroscópico de DC y UV-vis.

El análisis de los datos obtenidos en el estudio espectroscópico de la valoración con $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$ de Zn-MT3 en las condiciones estándar de trabajo (solución $10 \mu\text{M}$ de proteína, a pH 4.5, 25°C), evidencian que los iones Pb(II) se coordinan a la proteína provocando la aparición de nuevas absorciones en los espectros de DC y UV-vis (Fig. 108, Tabla 27).

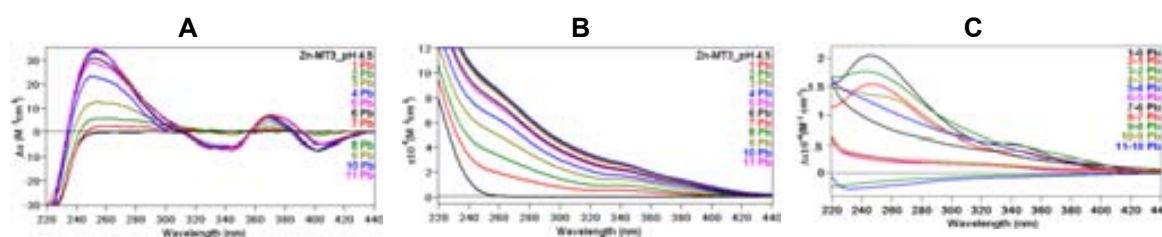


Figura 108. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de la preparación $10 \mu\text{M}$ de Zn-MT3 a pH 4.5 y 25°C hasta 11 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

DC	UV-vis	dif. UV-vis
254(+), 340(-), 375(+), 404(-) nm	260, 350 nm	250, 350 nm

Tabla 27. Absorciones correspondientes a los espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis de la valoración de la preparación $10 \mu\text{M}$ de Zn-MT3 a pH 4.5 y 25°C hasta 11 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

El conjunto de datos espectroscópicos de DC y UV-vis (Fig. 108) muestran una variación espectral desde la adición del 1° eq de Pb(II) hasta llegar a un punto de saturación entre el 5° y 6° eq de Pb(II) añadido, como se puede ver en la gráfica de absorbancia (a 260 y 350 nm) vs. equivalentes de Pb(II) añadidos a Zn-MT3 (Fig. 109), así también se pudo observar que a partir del 10° eq de Pb(II) empieza a disminuir la intensidad de las señales espectroscópicas.

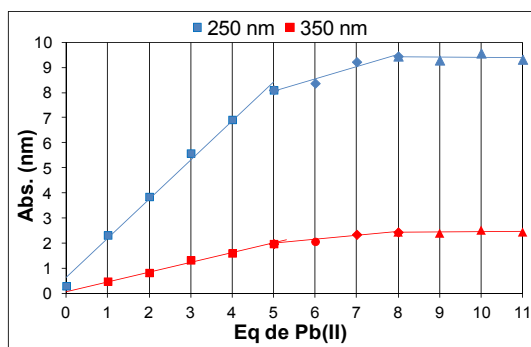


Figura 109. Gráficas de absorbancias vs. eq de Pb(II) a 250 y 350 nm, de la valoración de la preparación 10 μ M de Zn-MT3 a pH 4.5 y 25 °C hasta 11 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros alcanzan su máxima intensidad tras la adición de 6 iones plomo(II), mientras que para el 7° eq de Pb(II) añadido se observa un leve cambio en las absorciones de DC entre 370-420 nm (Fig. 108 A), las adiciones posteriores no modifican la forma y la intensidad de los espectros, es decir, la muestra de proteína mantiene la quiralidad de las especies Pb-MT3 formadas.

Los espectros de DC (Fig. 108A) muestran cuatro absorciones anchas: entre 240-300(+), 320-360(-), 360-380(+) y una centrada a 400(-) nm. Estas señales, presentan una primera etapa desde el 1° hasta el 3° eq de Pb(II) aumentando la intensidad con los siguientes puntos isodicroicos: 318, 358 y 390 nm, y una segunda etapa, a partir del 4° eq de Pb(II) donde las absorciones son más definidas y sólo mantienen los puntos isodicroicos 358 y 390 nm.

Por otro lado, en los espectros de UV-vis (Fig. 108B) se observan sólo dos absorciones: a 260 y otra a 350 nm denominadas de *tipo II*, que se hacen más intensas a medida que se adicionan los iones Pb(II) hasta la saturación de la proteína.

En cambio, los espectros de dif. UV-vis (Fig. 110) muestran más de un tipo de absorciones: para el 1° y 2° eq de Pb(II) las de *tipo II*, y luego para el 3° eq de Pb(II) hay leve desplazamiento de la absorción de 350 a 360 nm. La mayor diferencia se observó para el 4° eq de Pb(II) añadido que provoca la aparición de tres nuevas absorciones a 270, 315 y 390 nm. A partir de la adición del 5° eq de Pb(II) se observa una absorción a 340 nm poco definida. Esto indica que la coordinación de plomo a la proteína se da en

más de un proceso de unión dependiendo del número de equivalentes de Pb(II) añadidos, es decir, mostrando diferentes sitios de coordinación.

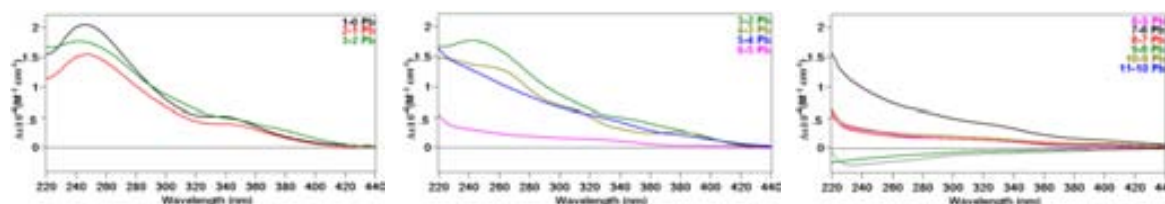


Figura 110. Evolución de los espectros de dif. UV-vis de la valoración de la preparación 10 μM de Zn-MT3 a pH 4.5 y 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 11 equivalentes de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Una vez evidenciado la coordinación de los iones Pb(II) a la preparación Zn-MT3 en condiciones estándar, se realizó una nueva valoración aumentando la temperatura a 55 $^{\circ}\text{C}$. Los espectros de DC y UV-vis (Fig. 111A-B) muestran la aparición de absorciones similares pero menos intensas que en la valoración a 25 $^{\circ}\text{C}$.

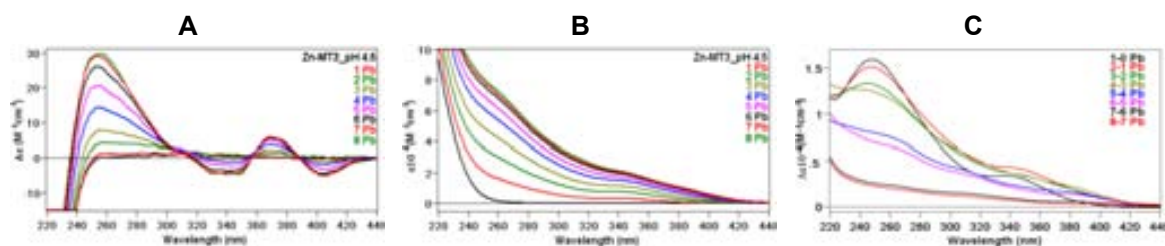


Figura 111. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de la preparación 10 μM de Zn-MT3 a pH 4.5 y 55 $^{\circ}\text{C}$ hasta 8 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 111A) muestran un aumento de la intensidad de las absorciones desde el 1 $^{\circ}$ hasta el 7 $^{\circ}$ eq de Pb(II), manteniendo en todo momento un proceso isodicroico. A diferencia de la valoración a 25 $^{\circ}\text{C}$, no se observa una desestructuración de la proteína tras la adición del 7 $^{\circ}$ eq de Pb(II).

Los espectros de UV-vis (Fig. 111B) se saturan totalmente para el 6 $^{\circ}$ eq de Pb(II), pero cada equivalente añadido sigue una evolución diferente como se observó en los espectros de dif. UV-vis (Fig. 111C). La contribución del 1 $^{\circ}$ y 2 $^{\circ}$ eq de Pb(II) muestran absorciones a 250 y 350 nm como las observadas a 25 $^{\circ}\text{C}$, para el 3 $^{\circ}$ y 4 $^{\circ}$ eq de Pb(II) se observa un desplazamiento de la absorción a 350 nm, y en cambio para el 5 $^{\circ}$ y 6 $^{\circ}$ eq aparecen bandas a 260, 310 y 390 nm. Por último, para el 7 $^{\circ}$ y 8 $^{\circ}$ eq de Pb(II) añadido no se observan absorciones definidas.

Las señales espectroscópicas muestran una saturación de Zn-MT3 entre 6 y 7 iones Pb(II). El aumento de la temperatura provocó una disminución en los t_{est} por equivalentes de Pb(II) que igualmente no son muy largos en comparación a los observados en Zn₇-MT1 y Zn₇-MT2.

Otro de los factores que se estudió es la concentración de la preparación Zn-MT3, para así conocer el efecto que pueda tener en la interacción de los iones Pb(II) con una solución de proteína más o menos concentrada. Para esto se realizaron valoraciones con Pb(II) de Zn-MT3 a una mayor y menor concentración, 20 y 5 μM , respectivamente, manteniendo las otras variables en condiciones estándar (pH 4.5 y 55 $^{\circ}\text{C}$).

En los espectros de DC y UV-vis (Fig. 112A-B) obtenidos de la valoración con Pb(II) de Zn-MT3 a 20 μM , se observaron que las absorciones son análogas a las observadas en la valoración a 10 μM , pero éstas son más intensas y muestran una saturación de la proteínas entre 7 y 8 equivalentes de Pb(II).

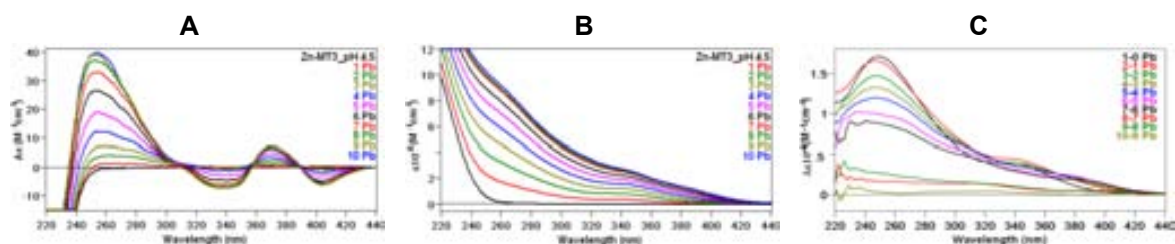


Figura 112. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de la preparación 20 μM de Zn₇-MT3 a pH 4.5 y 55 $^{\circ}\text{C}$ hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Las señales de DC mantienen tres puntos isodicroicos (318, 358 y 390 nm) similares a los observados en las valoraciones con las otras condiciones. Los espectros de dif. UV-vis (Fig. 112C) presentan absorciones con algunas diferencias a las observadas en Zn-MT3 a 10 μM en presencia de Pb(II).

Por su parte, en los espectros de DC y UV-vis (Fig. 113) obtenidos en la valoración de Zn-MT3 a 5 μM frente a Pb(II), se observó que las absorciones son semejantes a las mostradas en las valoraciones a 10 y 20 μM , pero éstas son poco intensas y definidas. Los espectros de DC (Fig. 113A) siguen un proceso con menos puntos isodicroicos y presentan una saturación parcial de Zn-MT3 para el 4^o eq de Pb(II) añadido y una total tras la adición de 7 iones plomo(II). Las señales en los espectros de UV-vis (Fig. 113B) muestran la saturación de la proteína entre 4 y 5 iones Pb(II) añadidos a diferencia de las otras valoraciones.

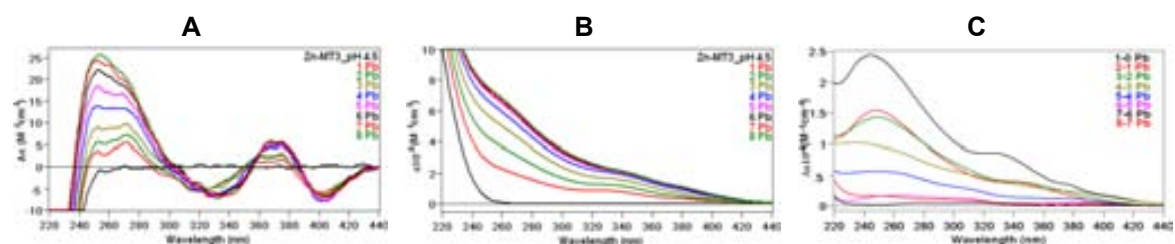


Figura 113. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de la preparación 5 μM de Zn-MT3 a pH 4.5 y 55 $^{\circ}\text{C}$ hasta 8 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 113C) se observó un proceso diferente a las otras valoraciones, ya que la incorporación del 1° eq de Pb(II) a Zn-MT3 provoca la aparición de tres absorciones: 250, 340 y 380 nm, similares a las de *tipo I* observadas anteriormente cuando Zn-MT1 enlaza Pb(II). Mientras que, tras la coordinación del 2° y 3° eq de Pb(II) aparecen las absorciones a 250 y 350 nm, asignadas de *tipo II*. A partir del 4° eq de Pb(II) enlazado aparecen otras señales poco intensas. Esto indica que la formación de las especies Pb-MT3 sigue un proceso diferente al observado en las otras condiciones.

Otro de los factores que se ha estudiado es el pH, para esto se realizó una valoración con iguales condiciones estándar de concentración y temperatura (10 μ M, 25 °C), pero a pH 7.0 (Fig. 114).

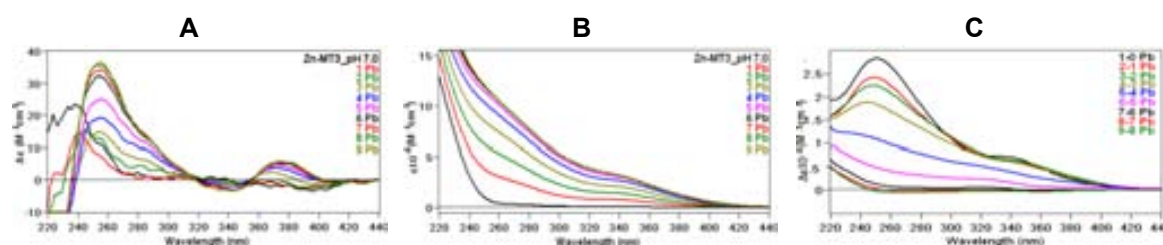


Figura 114. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de la preparación 10 μ M de Zn-MT3 a pH 7.0 y 25 °C hasta 9 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los resultados obtenidos a pH neutro muestran absorciones análogas a las observadas a pH 4.5, pero no son tan definidas revelando una menor estructuración de Zn-MT3 en presencia de Pb(II). Las señales espectroscópicas de DC muestran una saturación parcial de la proteína a partir del 6° eq de Pb(II) y una total para 9 eq de Pb(II) añadidos. En cambio, en los espectros de UV-vis se observa una saturación tras la incorporación del 5° eq de Pb(II) a Zn-MT3.

Los espectros de DC (Fig. 114A) muestran dos absorciones positivas centradas a 260 y 380 nm bien definidas, en cambio las señales negativas no se forman del todo, especialmente la señal a 410(-) nm, que se diferencian a las observadas a pH ácido.

En los espectros de UV-vis (Fig. 114B) se observan dos absorciones a 260 y 350 nm similares a las de Zn-MT3 a pH 4.5 frente a Pb(II). En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 114C) se observó que el 1° eq de Pb(II) añadido muestra dos absorciones a 250 y 340 nm, y la coordinación del 2°, 3° y 4° eq de Pb(II) mantiene la absorción a 250 nm pero la segunda señal se desplaza levemente a 350 nm. Para las adiciones posteriores del 5° y 6° eq de Pb(II) ya no se observan absorciones definidas, y a partir de los 7 iones plomo(II) añadidos no hay más contribuciones.

De igual manera que el experimento anterior, se realizó una nueva valoración en condiciones similares de concentración de proteína y pH (solución 10 μ M de la

preparación Zn-MT3, pH 7.0) pero aumentando la temperatura a 55 °C, para ver si ésta influía en la estructuración de la proteína o en el t_{est} requerido para cada equivalente de Pb(II) añadido. En los espectros de DC y UV-vis (Fig. 115A-B) se observó la aparición de absorciones bien definidas e intensas, que son indicativas de una mayor estructuración de la proteína frente a Pb(II), es decir, las especies Pb-MT3 formadas tienen una mayor quiralidad.

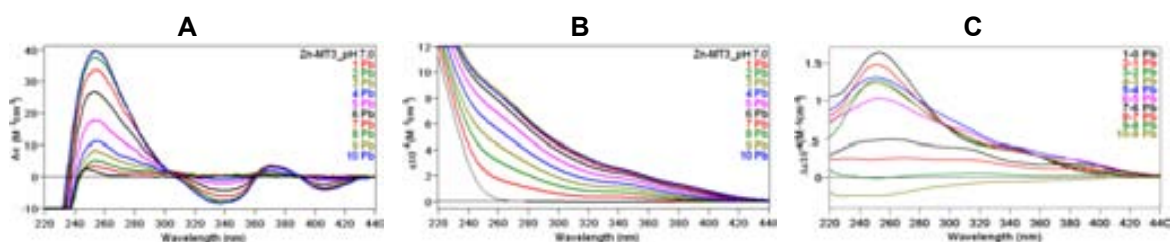


Figura 115. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 10 μ M de la preparación Zn-MT3 a pH 7.0 y 55 °C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 115A) muestran un conjunto de absorciones que siguen un proceso isodicroico bien definido, diferente al obtenido en similares condiciones pero a temperatura ambiente, sin embargo es análogo al observado a pH 4.5. Las señales espectroscópicas muestran la saturación de Zn-MT3 en dos etapas: una parcial, sobre los 360 nm, a partir del 7° eq de Pb(II) añadido; y otra total tras la adición del 9° eq de Pb(II).

Los espectros de UV-vis (Fig. 115B) presentan dos absorciones asignadas como de tipo II, que señalan la saturación de Zn-MT3 tras el 7° eq de Pb(II) añadido. Y en los espectros de dif. UV-vis (Fig. 115C) se observan diferentes señales a lo largo de la valoración.

Por otra parte, siguiendo con este estudio se realizó una valoración de la preparación Zn-MT3 con Pb(II) en condiciones similares a las fisiológicas: pH 7.0 y 37 °C (Fig. 116). El análisis detallado de los datos espectroscópicos reveló la coordinación del ión Pb(II) a la proteína.

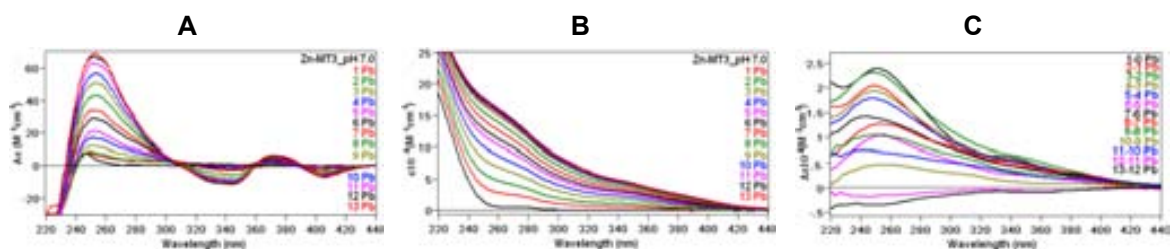


Figura 116. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 10 μ M de la preparación Zn-MT3 a pH 7.0 y 37 °C hasta 13 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

En los espectros de DC (Fig. 116A) se observó la aparición de cuatro absorciones: 280(+), 330(-), 375(+), y 400(-) nm, con un proceso isodicroico bien definido, análogas a las observadas en las valoraciones anteriores de Zn-MT3 frente a Pb(II). En los espectros de UV-vis (Fig. 116B) se observan dos absorciones a 250 y 350 nm, de *tipo II*. En ambos espectros se observó que la incorporación de Pb(II) transcurre en dos etapas: la primera, desde el 1° al 6° eq de Pb(II) y la segunda, a partir del 7° al 11° eq de Pb(II), una vez añadidos estos iones la proteína comienza a saturarse.

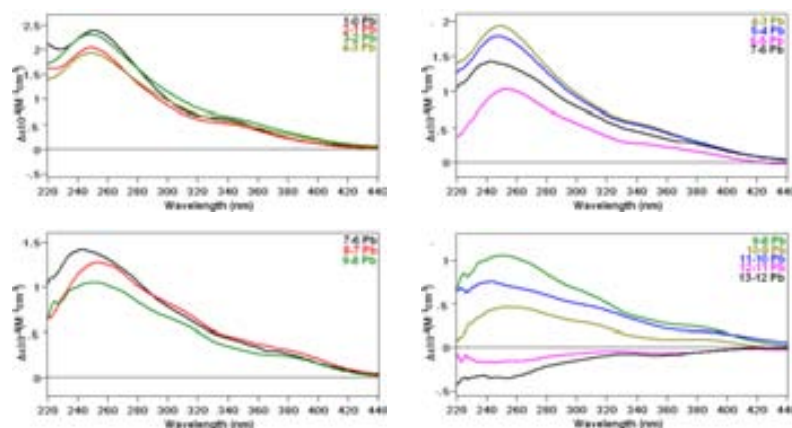
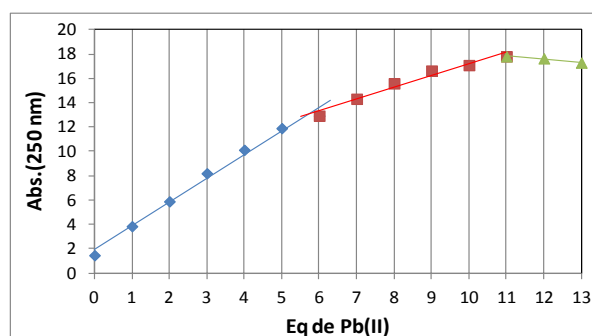


Figura 117. Espectros de dif. UV-vis de la valoración de una solución 10 μM de la preparación Zn-MT3 a pH 7.0 y 37 $^{\circ}\text{C}$ hasta 13 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 117) se observó que las absorciones no varían notoriamente a medida que se añaden los equivalentes de Pb(II) a Zn-MT3, manteniéndose las de *tipo II* desde el 1° hasta el 5° eq de Pb(II), pero la adición del 6° eq Pb(II) provoca un desplazamiento de la absorción 350 nm, y a partir del 7° hasta el 11° eq de Pb(II) aparece una leve absorción a 380 nm. Después de los 12 iones plomo añadidos las absorciones son negativas.

Las señales espectroscópicas de DC y UV-vis muestran que se llega a una situación de saturación parcial de la proteína para el 6° eq de Pb(II) añadido y una final para la adición del 11° y 12° eq de Pb(II). Esto a su vez se pudo observar en la gráfica de Abs. a 250 nm vs. Eq de Pb(II) añadidos (Fig. 118), que además muestra que tras la incorporación de 12 eq de Pb(II) a Zn-MT3 comienza a disminuir la absorbancia.

Figura 118. Variación de la absorción a una λ determinada en función del número de equivalentes de Pb(II) añadidos a lo largo de la valoración de una solución 10 μM de la preparación Zn-MT3 con $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$, a pH 7.0 y a 37 $^{\circ}\text{C}$.



Para seguir con el estudio de Zn-MT3 en condiciones de pH 7.0 y 37 °C, se realizaron otras valoraciones, pero esta vez aumentando y disminuyendo la concentración respecto a la estándar, es decir, a 20 y 5 μ M.

En los espectros de DC y UV-vis (Fig 119) obtenidos en la valoración con Pb(II) de la preparación Zn-MT3 a 20 μ M, se observaron la aparición de absorciones análogas a las antes vistas en las otras condiciones ensayadas.

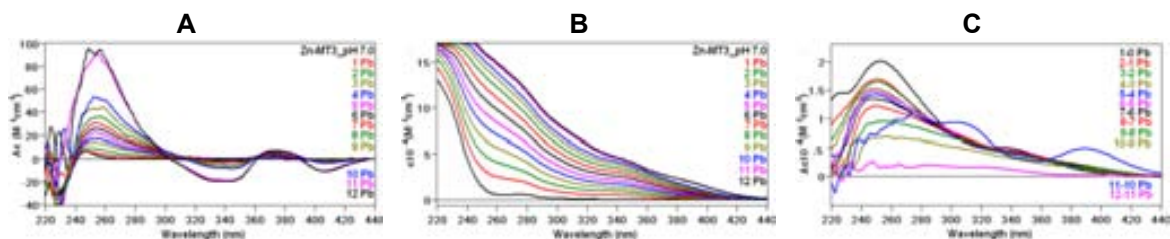


Figura 119. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μ M de la preparación Zn-MT3 a pH 7.0 y 37 °C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

En los espectros de DC (Fig. 119A) se observó una gran diferencia de intensidad a partir del 1^o eq de Pb(II) añadido que puede ser efecto de un mayor tiempo de estabilización (más de 12 horas). En los espectros de UV-vis (Fig. 119B) se observó un cambio en las absorciones tras la adición de 11 iones plomo(II). En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 119 C) se observa la variación de estas señales, en donde aparecen (espectro azul) nuevas absorciones. Las señales espectroscópicas muestran la saturación de Zn-MT3 a partir del 11^o eq de Pb(II) añadido.

Por su parte, los espectros de DC y UV-vis (Fig. 120) registrados de la valoración con Pb(II) de Zn-MT3 a 5 μ M mostraron un conjunto de bandas semejantes a las observadas anteriormente, pero éstas son menos intensas que las obtenidas en Zn-MT3 a 10 μ M en presencia de plomo(II).

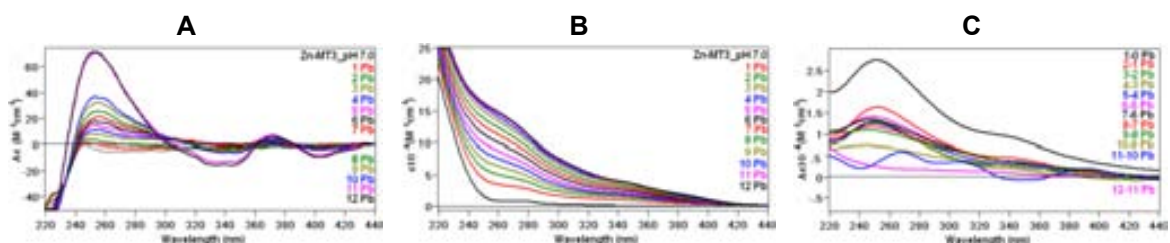


Figura 120. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 5 μ M de la preparación Zn-MT3 a pH 7.0 y 37 °C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

La saturación de las señales espectroscópicas se da para 11 iones Pb(II) añadidos a Zn-MT3. En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 120C) se observa la mayor contribución

para el 1° eq de Pb(II) que muestra dos absorciones de *tipo II* y para el 11° eq de Pb(II) aparecen absorciones similares a las observadas en los experimentos con concentración 20 μ M de proteína.

Los datos obtenidos de los espectros de DC y UV-vis nos indican que al adicionar iones Pb(II) a la preparación Zn-MT3, éstos se coordinan a la proteína provocando la aparición de un conjunto de absorciones que muestran una huella espectral característica y diferente a las observadas para las especies Pb-MT1 y Pb-MT2. La formación de los complejos Pb-MT3 se pueden ver afectada levemente por algunos factores como la concentración, temperatura y pH, estos efectos se expondrán más adelante en el apartado 3. (*Análisis de los factores experimentales que afectan la capacidad coordinante de las MTs de mamífero frente a Pb(II)*).

2.3.1.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS

En este apartado se presenta el análisis y comparación de los resultados obtenidos de la interacción de Pb(II) con Zn-MT3 por espectrometría de masas (ESI-MS). El análisis de estos espectros permiten obtener información sobre las especies que se forman al enlazarse el ión Pb(II) a la proteína, así como la estabilidad y evolución de éstas en el tiempo.

Los experimentos realizados mediante ESI-MS se llevaron a cabo siguiendo dos metodologías: añadiendo la misma cantidad de Pb(II) que el contenido de Zn(II) inicial; y añadiendo un gran exceso de Pb(II). En un primer estudio se llevó a cabo la adición de 7 eq de Pb(II) a una solución 10 μ M de la preparación Zn-MT3 a 25 °C y pH 7.0. En otro experimento similar, se añadieron 35 eq Pb(II) a esta proteína bajo las mismas condiciones experimentales. Estas muestras fueron analizadas a lo largo de 24 horas con el fin de observar la evolución de las especies formadas. En ambos experimentos los espectros de masas muestran la formación del mismo patrón de especies con algunos aductos de amonio y percloratos correspondientes a ellas.

El análisis de los resultados obtenidos tras la adición de 7 eq de Pb(II) a la solución proteica muestra que estos iones dan lugar a la formación de especies tanto homometálicas Pb-MT3 como heterometálicas Pb,Zn-MT3, como se puede observar en la Fig. 121, donde además se puede apreciar que en un primer momento (10 min) tras la adición de Pb(II), el pico más intenso corresponde a la especie Pb_9 -MT3 y aparecen otros picos de menor intensidad identificados como Pb_8Zn_1 - y Pb_{10} -MT3 de igual abundancia, seguidos por Pb_9Zn_1 - y Pb_8 - ,y otras menos abundantes como Pb_7Zn_1 - y Pb_6Zn_2 -MT3, manteniéndose hasta las 2 horas. A partir de las 4 horas de reacción los espectros de masas muestran una disminución de las especies homometálicas Pb-MT3 y un aumento de especies mixtas, siendo la más importante Pb_8Zn_1 - y luego sigue

Pb₇Zn₁- y Pb₉-MT3, y otras especies menos abundantes que suman entre 7 y 10 iones. A medida que avanza el tiempo de reacción hasta las 8 horas, se forma la especie inicial Zn₇-MT3 y cambian las intensidades de las otras especies, en donde la mayoritaria es Pb₇Zn₂-MT3, siguiendo en abundancia Pb₅Zn₃⁻, Pb₈Zn₁⁻, Pb₆Zn₂⁻ y Pb₇⁻, y menos abundantes Pb₇Zn₁⁻, Pb₅Zn₁⁻, Pb₄Zn₄⁻, Pb₃Zn₄⁻, Pb₂Zn₅⁻, y una especie homometálica Pb₉⁻, Pb₁Zn₆⁻, Pb₉Zn₁-MT3. Finalmente a las 24 horas, la especie Zn₇-MT3 se hace más intensa y la especie mayoritaria es Pb₅Zn₃-MT3 y le siguen Pb₆Zn₂⁻ y luego las otras especies como: Pb₇Zn₂⁻, Pb₅Zn₁⁻, Pb₈Zn₁⁻, Pb₇Zn₁-MT3 y otras menos abundantes como las mencionadas anteriormente.

A diferencia de lo observado anteriormente, en el experimento de la preparación Zn-MT3 en presencia de un exceso de 35 iones Pb(II) se observó en los espectros de masas (Fig. 122) que la formación de especies homometálicas Pb-MT3 tiene un mayor número de iones de hasta Pb₁₁-MT3, y menos especies mixtas Pb,Zn-MT3. Al registrar los espectros del tiempo inicial (10 min) se observó la formación de las especies mayoritariamente homometálicas como Pb₁₀⁻, Pb₉⁻, y la especie mixta Pb₈Zn₁⁻, Pb₈- hasta Pb₁₁-MT3, en orden de abundancia, esto se mantiene hasta las 2 horas. A partir de las 4 horas de reacción se observan más especies mixtas como: Pb₈Zn₁⁻, Pb₉Zn₁⁻, Pb₇Zn₁⁻, Pb₇Zn₂⁻ y Pb₆Zn₂-MT3 en orden de abundancia, pero las más intensas son las homometálicas: Pb₉⁻ y Pb₁₀-MT3.

Tras 8 horas la especie mayoritaria es Pb₈Zn₁-MT3 seguida de Pb₉-MT3, mientras las otras especies se mantienen con similares intensidades, observándose un aumento de las especies mixtas. A medida que avanza el tiempo de reacción hasta las 24 horas, se observó que las especies formadas con mayor intensidad son Pb₉⁻, Pb₈Zn₁⁻, Pb₁₀⁻ y Pb₉Zn₁⁻ y luego con menor intensidad están las especies Pb₇Zn₁⁻, Pb₇Zn₂⁻, Pb₆Zn₂⁻, Pb₈⁻, Pb₅Zn₃⁻, Pb₄Zn₄-MT3.

De todas estas observaciones se puede inferir que la preparación Zn-MT3 al estar a pH 7.0 mantiene coordinados sus iones Zn(II) y en presencia de Pb(II) se forman las especies mixtas de contenido de Pb(II) y Zn(II), en donde al cabo de 24 horas de reacción al añadir una baja cantidad de iones plomo se mantienen las especies con 5 y 6 plomos coordinados: Pb₅Zn₃⁻ y Pb₆Zn₂-MT3, en cambio en presencia de un exceso de plomo las especies más abundantes son Pb₉⁻, Pb₁₀⁻ y Pb₈Zn₁-MT3 donde se coordinan a la proteína 9 y 10 iones metálicos, con mayoría en contenido en plomo. También se observó una estabilidad del contenido de plomo(II) en la proteína en un largo tiempo de reacción (24 horas).

En relación a los resultados observados anteriormente por espectroscopía de DC y UV-vis, se puede recordar que la saturación de Zn-MT3 se da entre 5 y 6 iones Pb(II) añadidos en similares condiciones (10 μ M de proteína, pH 7.0 y 25 °C). Y en

condiciones de 55 °C se observaron saturaciones entre el 8° y 9° eq de Pb(II) adicionado, por lo que los resultados espectroscópicos tienen cierta concordancia con los observados por ESI-MS.

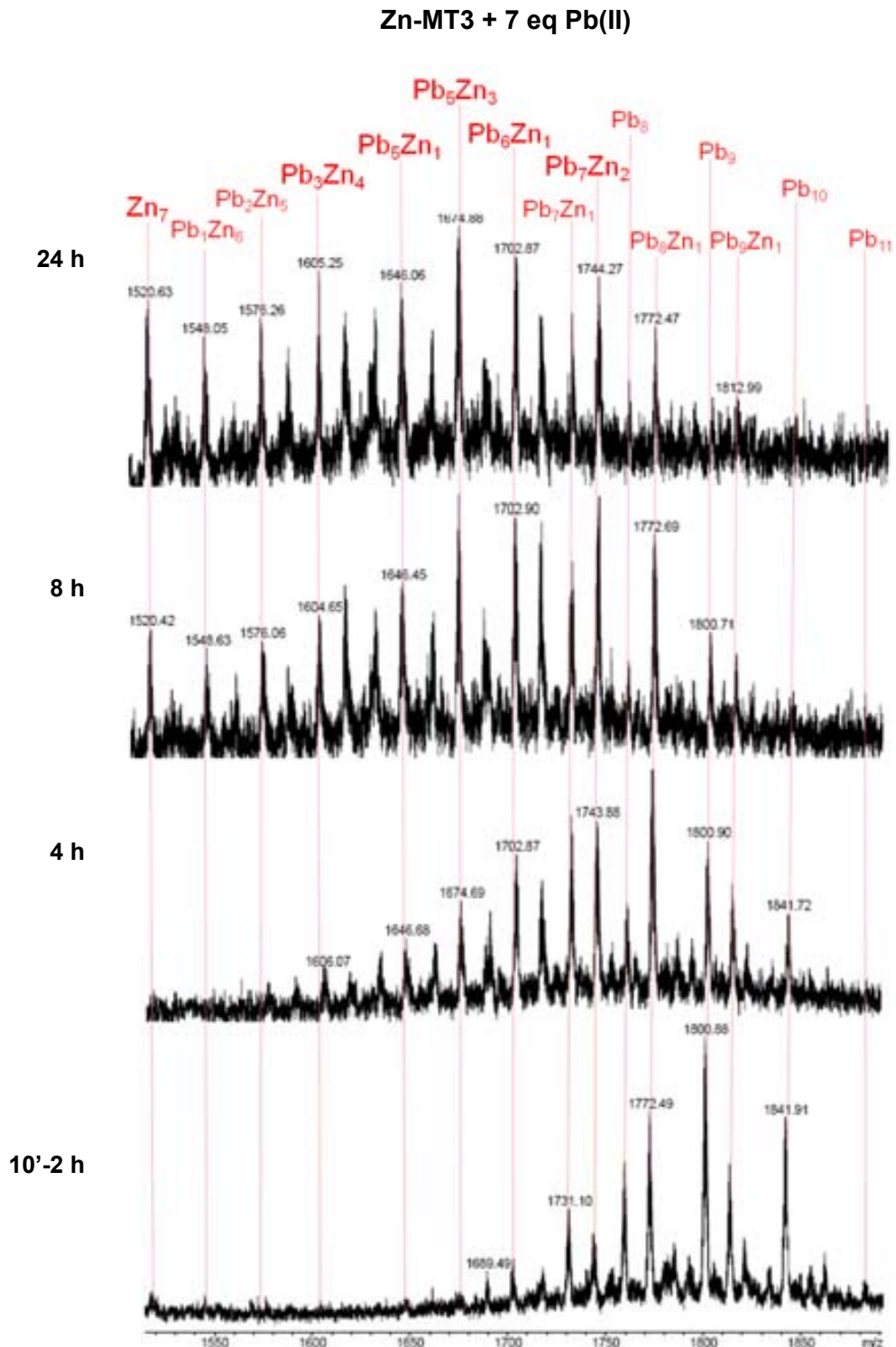


Figura 121. Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la evolución de una solución 10 µM de la preparación Zn-MT3, a pH 7.0 y 25 °C, tras la adición de 7 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +5, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

Zn-MT3 + 35 eq Pb(II)

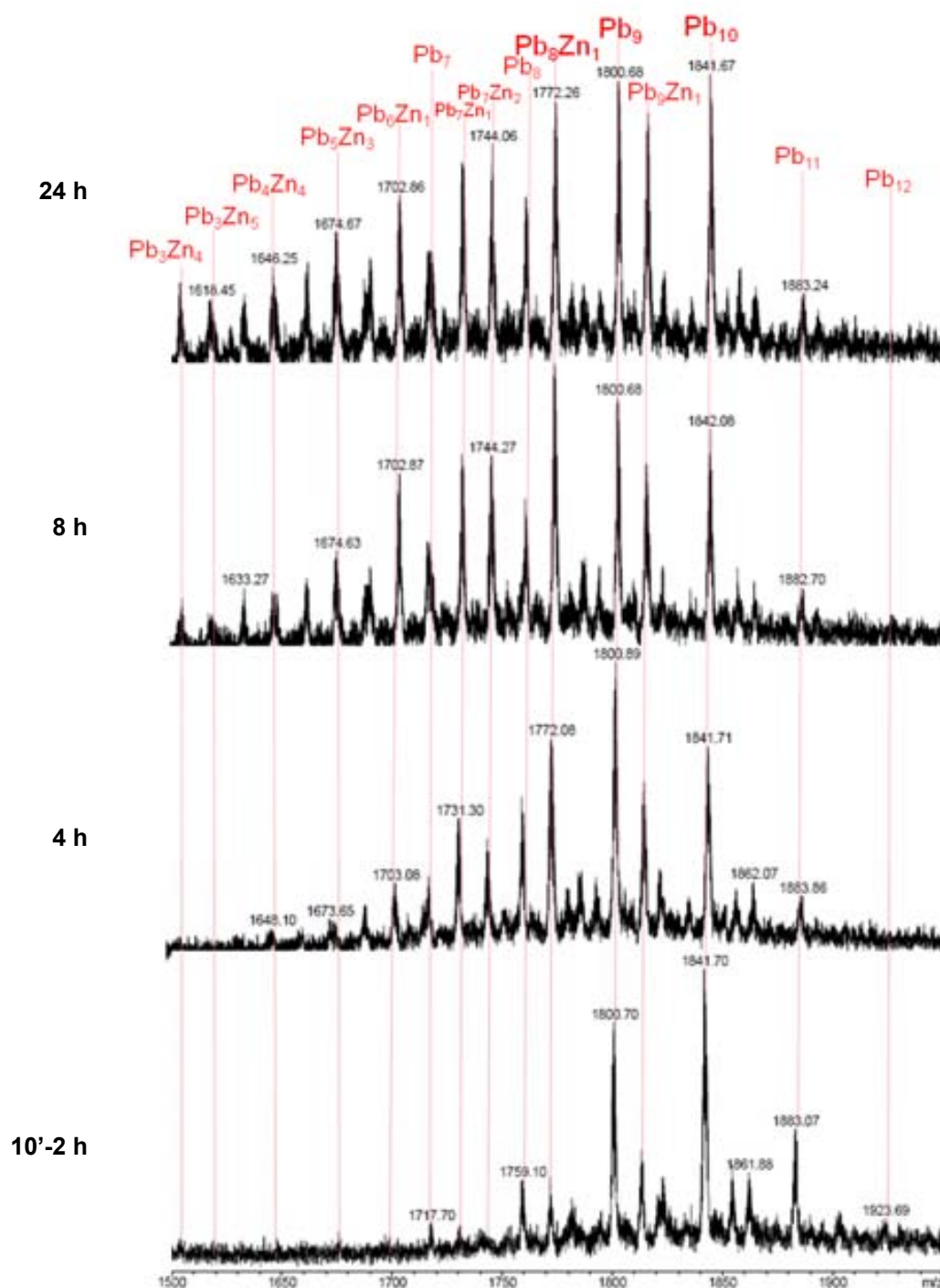


Figura 122. Espectros de ESI-MS registrados durante 8 horas que muestran la evolución de una solución 10 μ M de la preparación Zn-MT3, a pH 7.0 y 25 $^{\circ}$ C, tras la adición de 35 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +5, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

También se realizó un experimento que se llevó a cabo en condiciones fisiológicas, a pH 7.0 y 37 $^{\circ}$ C, con una concentración 10 μ M de la preparación Zn-MT3, en donde se añadieron 10 eq de Pb(II), por ser una cantidad suficiente para saturar esta proteína y se midió hasta un máximo de 24 horas.

Zn-MT3 + 10 eq Pb(II)

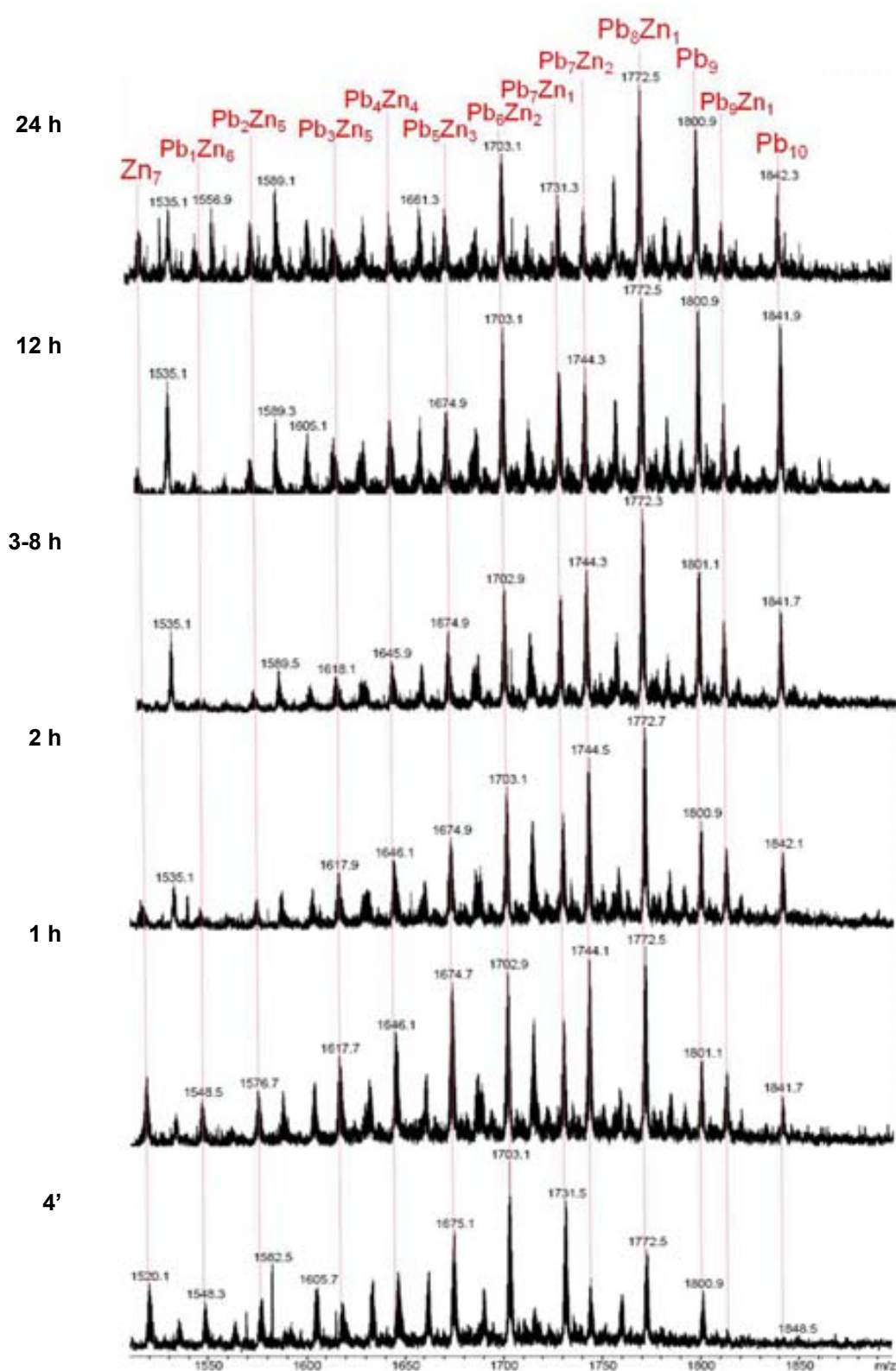


Figura 123. Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la evolución de una solución 10 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT3}$, a pH 7.0 y 37 $^\circ\text{C}$, tras la adición de 10 eq de Pb(II) . Los espectros muestran el estado de carga +5, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

Los espectros registrados (Fig. 123) revelan que la especie inicial Zn₇-MT3 se mantiene, pero además aparecen especies homometálicas Pb-MT3 y heterometálicas Pb_xZn_y-MT3, siendo la más abundante la especie Pb₆Zn₂⁻, seguida por Pb₇Zn₁⁻, Pb₅Zn₃⁻, Pb₈Zn₁⁻, Pb₄Zn₄⁻, Pb₇Zn₂⁻ y Pb₉-MT3, entre otras. A partir de 1 hora la especie Zn₇-MT3 mantiene su intensidad, pero las especies formadas anteriormente varían en sus intensidades siguiendo un patrón de especies mixtas con un contenido metálico entre 7 y 10 iones en su mayoría de Pb(II) como son: Pb₈Zn₁⁻, Pb₇Zn₂⁻, Pb₆Zn₂⁻, Pb₅Zn₃-MT3 siendo éstas las más abundantes, Pb₄Zn₄⁻, Pb₃Zn₅⁻, Pb₉⁻, Pb₉Zn₁⁻, Pb₂Zn₅⁻, Pb₁Zn₆⁻ y Pb₁₀-MT3 en orden de intensidad. Al cabo de 2 horas la especie inicial Zn₇-MT3 disminuye en intensidad, y se mantiene el mismo patrón de especies formadas anteriormente. A medida que transcurren 3 horas se observa casi la desaparición de la especie Zn₇-MT3, mientras las especies Pb₉⁻ y Pb₁₀-MT3 se hacen más intensas. Tras las 5 horas comienza a variar la abundancia de las especies formadas, pero se mantiene como la especie más importante Pb₈Zn₁⁻, seguida por Pb₉⁻, Pb₆Zn₂⁻, Pb₁₀⁻, Pb₇Zn₁⁻, Pb₇Zn₂⁻ y Pb₈-MT3, hasta las 8 horas. A las 12 horas comienza a formarse nuevamente la especie Zn₇-MT3 y las otras especies se mantienen tras 24 horas de reacción.

Así, el conjunto de datos parece indicar que en estas condiciones, se forman inicialmente un conjunto de especies Pb_xZn_y-MT1 (x+y= 8, 9 ó 10) que son estables en el tiempo (24 horas) y que mantienen un equilibrio con la especie Zn₇-MT3 al inicio (hasta 2 horas) y final (a partir de las 12 horas) de la reacción.

Cabe destacar que en los tres experimentos de ESI-MS, la mayoría de las especies formadas, sean mixtas como homometálicas de Pb(II), contienen entre 8 y 10 iones metálicos (excepto Pb₁Zn₆⁻, Pb₂Zn₅-MT3, entre otras).

2.3.1.3. Estudio por microcalorimetría, ITC

Con la finalidad de obtener datos termodinámicos referentes al desplazamiento de Zn(II) por Pb(II) se valora Zn-MT3 con Pb(II) mediante un experimento de ITC, en condiciones estándar de trabajo análogas a las utilizadas para el estudio espectroscópico, es decir, una concentración 10 μ M de proteína, pH 4.5 y 25 °C.

$K \times 10^{-5}$	ΔG (cal/mol)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/molK)	N (Eq de Pb(II))
4.23 \pm 0.35	-7667	-8709 \pm 105	-3.41	5.64 \pm 0.05

Tabla 28. Datos termodinámicos obtenidos a partir del experimento de ITC de la valoración con Pb(II) de la preparación Zn-MT3 a 20 μ M, pH 4.5 y 25 °C. El resultado de ΔG se ha obtenido a partir de la fórmula $\Delta G = -RT \ln K$.

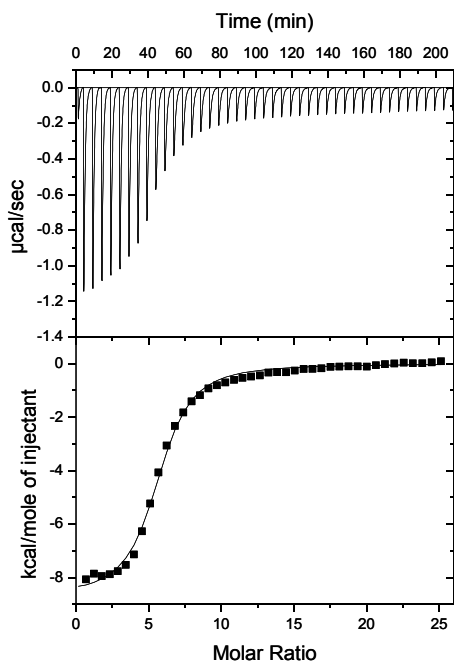


Figura 124. Termograma (arriba) y representación del calor desprendido (abajo) frente a los eq de Pb(II) añadidos a una solución 9.29 μM de Zn-MT3 a pH 4.5 y 25 $^{\circ}\text{C}$, de acuerdo con la metodología descrita en los apartados III y VI-2.

Los resultados obtenidos en esta valoración por ITC (Fig.124, Tabla 28), muestra que el desplazamiento de Zn(II) por Pb(II) se da en un proceso termodinámicamente favorable, tanto entrópica como entálpicamente, con un ΔG -7667 cal/mol. La diferencia de entropía (ΔS) es de -3.41 cal/molK indica que la formación de los nuevos clústeres es desfavorable y además revela que éstos presentan un menor desorden molecular que los de Zn(II). Además la diferencia de entalpía (ΔH) denota una reacción exotérmica.

Así también esta valoración muestra que el número de iones Pb(II) que se enlazan a Zn-MT3 es aproximadamente 6 iones Pb(II) (5.64 ± 0.05) con sitios de coordinación idénticos, ya que al comparar la curva teórica con la experimental estas coinciden (Fig. 124). Esto puede ser comparable con la saturación parcial de Zn-MT3 para el 6 $^{\circ}$ eq de Pb(II) observada en los espectros de DC y UV-vis. Así también, en los espectros de masas se muestra una especie mixta $\text{Pb}_6\text{Zn}_2\text{-MT3}$ que se mantiene en el tiempo.

2.3.2. Dominio αMT3

2.3.2.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis

El presente estudio de la habilidad coordinante de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ frente a Pb(II), se ha llevado a cabo mediante las valoraciones con Pb(II) en diferentes condiciones experimentales registradas por espectroscopía de DC y UV-vis, que se detallan en la tabla siguiente.

Concentración (μM)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH	
20	25	4.5	7.0
	37	7.0	

Tabla 29. Condiciones experimentales de las valoraciones de Zn- α MT3 con Pb(II) para el estudio espectroscópico de DC y UV-vis.

El primer análisis se realizará a partir de la valoración con Pb(II) de Zn₄- α MT3 en las condiciones estándar de trabajo: una concentración 20 μM de proteína, a pH 4.5 y 25 $^{\circ}\text{C}$. Luego se comparará con los resultados al variar el pH a 7.0 y por último, se analizarán las condiciones similares a las fisiológicas (37 $^{\circ}\text{C}$ y pH 7.0).

El estudio espectroscópico de la valoración de Zn₄- α MT3 frente a Pb(II) en condiciones de trabajo, reveló la coordinación de los iones Pb(II) a este dominio, por medio de la aparición de absorciones en el DC y en el UV-vis (Fig. 125, Tabla 30), que muestran la estructuración y formación de los enlaces de los clústeres Pb- α MT3.

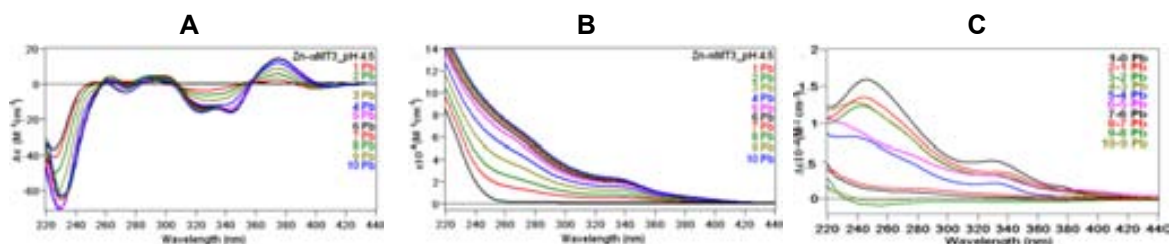


Figura 125. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μM de Zn₄- α MT3 a pH 4.5 y 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

DC	UV-vis	dif. UV-vis
230(-), 261(+,-), 275(-), 300(+), 330(-), 375(+), 410(-) nm	250, 340 nm	250, 340 nm

Tabla 30. Absorciones correspondientes a los espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis de la valoración de una solución 20 μM de Zn- α MT3 a pH 4.5 y 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 126) muestran absorciones negativas y positivas: 260(- y +), 270(-) y 300(+), 330(-) ancha, 375(+), 410(-) nm, estas señales aumentan en intensidad hasta el 4^o eq de Pb(II) añadido, mostrando una evolución espectral con tres puntos isodicroicos: 285, 310 y 358 nm (Fig. 126A, círculos). A partir de la adición del 5^o eq de Pb(II) hay un cambio en la estructuración de la proteína, que se observa en el desplazamiento de las señales entre los 250 y 300 nm (Fig. 126B, círculo verde), además de una variación de una sola banda ancha a dividirse en dos a 325 y 343 nm (Fig. 125B, círculo gris). Las señales muestran la saturación total de Zn₄- α MT3 para el 6^o eq de Pb(II) añadido.

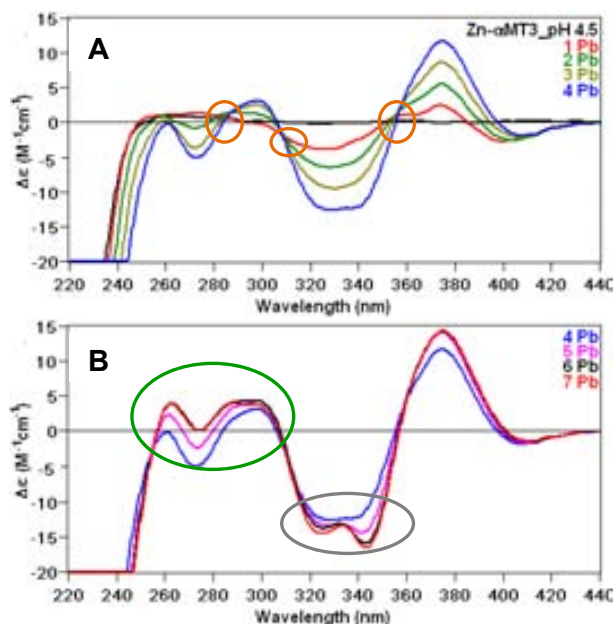


Figura 126. Espectros de DC: (A) del 1° al 4° eq de Pb (II) y (B) del 4° al 7° eq de Pb(II) añadido en la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ a pH 4.5 y 25 $^\circ\text{C}$.

Los espectros de UV-vis (Fig. 125B) presentan dos absorciones una a 250 y otra a 340 nm, *tipo II*, que aumentan en intensidad hasta el 6° eq de Pb(II) añadido, la adición de más iones plomo no reflejan ningún cambio en los espectros.

En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 127) se observa que la incorporación del 1° eq de Pb(II) añadido a $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ muestra tres absorciones 250, 330 y 375 nm, mientras que para las adiciones desde el 2° hasta el 5° eq de Pb(II) aparecen las señales de *tipo II*, esto evidencia dos entornos de coordinación diferentes.

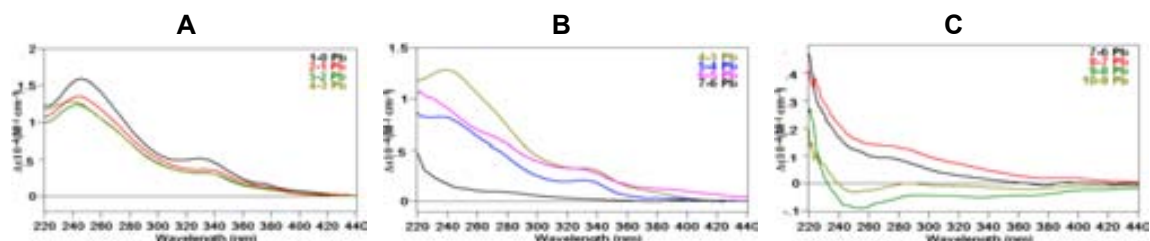


Figura 127. Evolución de los espectros de dif. UV-vis de (A) 1°-4°, (B) 4°-7° y (C) 7°-10° eq de Pb(II) de la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ a pH 4.5 y 25 $^\circ\text{C}$.

La saturación de las señales espectroscópicas, tanto para el DC y el UV-vis, se observan para el 5° eq de Pb(II) y para el 6° eq de Pb(II) añadido, respectivamente, así como muestra la gráfica de absorbancia vs. eq de Pb(II) (Fig. 128) el punto de equivalencia para 6 iones plomo(II).

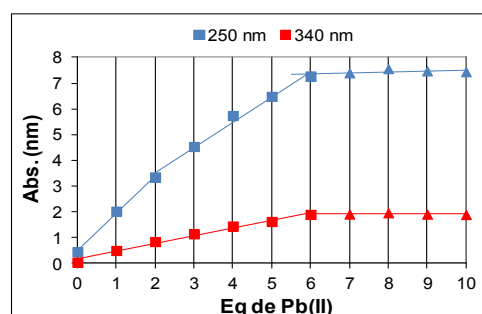


Figura 128. Gráfica de abs vs. eq de Pb(II) a 250 y 340 nm de la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ con 10 eq de Pb(II) a pH 4.5 y 25 $^\circ\text{C}$, concediendo máx. t_{est} .

En la valoración de una solución 20 μ M de Zn_4 - α MT3 con Pb(II) a 25 °C, en condiciones de pH 7.0, se observó un conjunto de espectros relativamente similares a los obtenidos a pH 4.5, tanto en el DC como en el UV-vis (Fig. 129). Las señales espectroscópicas de DC y UV-vis revelan la saturación de este dominio a partir del 5° eq de Pb(II) añadido.

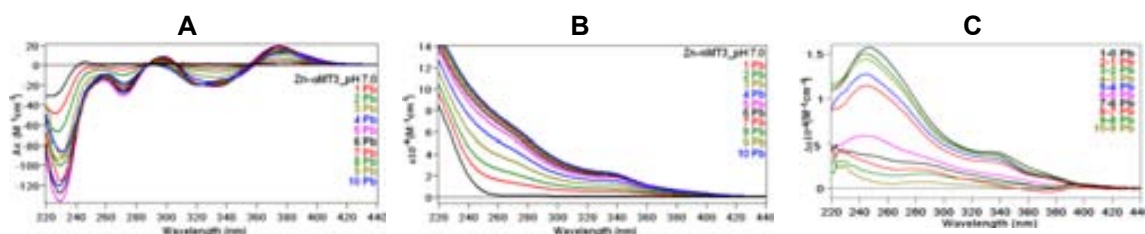


Figura 129. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μ M de Zn_4 - α MT3 a pH 7.0 y 25 °C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

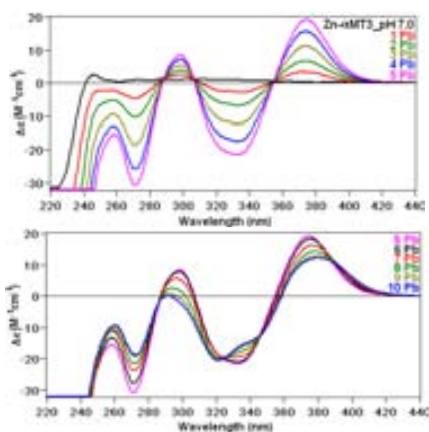


Figura 130. Evolución de los espectros de DC de la valoración de una solución 20 μ M de Zn_4 - α MT3 a pH 7.0 y 25 °C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 130) muestran absorciones que aumentan en intensidad (negativa y positivamente) desde el 1° hasta el 5° eq de Pb(II) añadido, manteniendo tres puntos isodicroicos. A partir de la incorporación del 6° eq de Pb(II) a Zn_4 - α MT3 las señales disminuyen su intensidad a causa de la desestructuración de la proteína, además tras la adición del 8° eq Pb(II) se observa un cambio entre 320 y 350 nm y aparecen dos nuevos puntos isodicroicos, que podría revelar una nueva estructuración de los clústeres Pb- α MT3.

Los espectros de UV-vis (Fig. 129B) muestran dos absorciones a 250 y 340 nm, de tipo II, que alcanzan su máxima intensidad para el 5° eq de Pb(II) añadido, y en los espectros de dif. UV-vis registrados (Fig. 129C) se observan las mismas absorciones a 250, 340 y una débil a 380 nm, desde el 2° eq de Pb(II) hasta la saturación de la proteína para 5 iones plomo(II), mientras que para las adiciones posteriores aparecen nuevas absorciones (290, 400 nm entre otras) que podrían indicar un cambio en la coordinación de Pb(II) a este dominio.

Una vez evidenciada la coordinación de Pb(II) a Zn_4 - α MT3 en ambos pHs, 4.5 y 7.0, se observó que las absorciones de DC son semejantes manteniendo algunos puntos isodicroicos, pero la banda entre 260-270(-) nm muestra una mayor intensidad a pH neutro que a 4.5 (Fig. 131). La saturación de Zn_4 - α MT3 a pH neutro se da después del

5° eq de Pb(II) añadido, mientras que a pH ácido esto ocurre para el 4° eq de Pb(II). Estas observaciones revelan una leve influencia del pH en la coordinación de Pb(II) a este dominio, aunque no afectó a los t_{est} de los iones Pb(II), siendo éstos cortos.

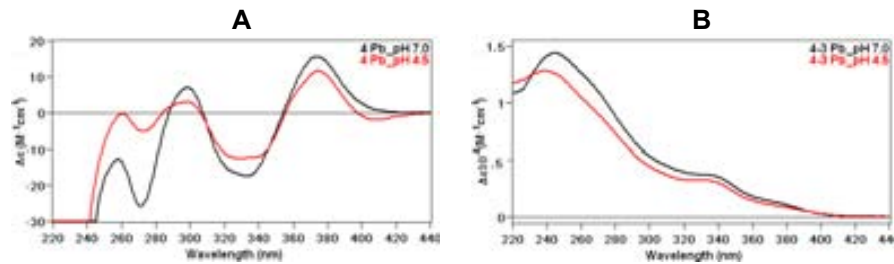


Figura 131. Comparación de espectros de (A) DC y (B) dif. UV-vis del 4° eq de Pb(II) añadido en las valoraciones de una solución 20 μ M de Zn₄- α MT3 a pH 7.0 y 4.5, a 25 °C.

El último análisis de la valoración de Zn₄- α MT3 frente a Pb(II) en condiciones similares a las fisiológicas, pH 7.0 y 37 °C, reveló la coordinación de plomo a este dominio, observándose señales espectroscópicas análogas a las observadas a 25 °C. Los espectros de DC y UV-vis (Fig. 132) muestran la saturación de Zn₄- α MT3 a partir del 5° eq de Pb(II) añadido.

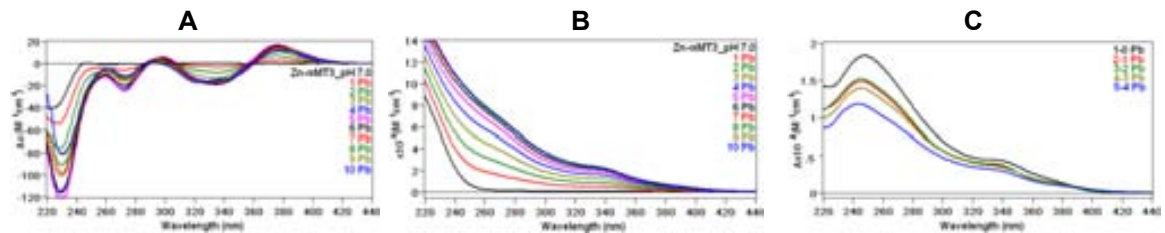


Figura 132. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μ M de Zn₄- α MT3 a pH 7.0 y 37 °C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 132A) muestran absorciones características de Pb- α MT3 que aumentan en intensidad desde la adición del 1° hasta el 5° de Pb(II) manteniendo puntos isodicroicos. A partir del 6° eq de Pb(II) añadido la absorción a 270(-) nm disminuye su intensidad, revelando la desestructuración de la proteína, como sucedió a 25 °C.

Las señales espectroscópicas de UV-vis (Fig. 132B) muestran la saturación parcial de Zn₄- α MT3 sobre los 340 nm para el 5° de Pb(II) añadido y de manera total tras la adición del 7° eq de Pb(II). Los espectros de dif. UV-vis (Fig. 132C) son análogos a los observados en la valoración a 25 °C, para el 1° eq de Pb(II) enlazado a este dominio aparecen dos absorciones a 250 y 340 nm que se reflejan en el UV-vis. Las adiciones del 2° hasta el 5° eq de Pb(II) muestran tres absorciones: 250, 340 y 380 nm.

En base a los resultados anteriores, la comparación de las valoraciones a 25 y 37 °C, revelan que la temperatura no tiene ningún efecto en la coordinación de Pb(II) y

saturación de este dominio, además la estructuración de $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ frente a Pb(II) es similar en los dos casos, como se puede observar en la Fig. 133. Así también, la evolución espectral indica que la formación de las especies Pb- αMT3 siguen el mismo proceso.

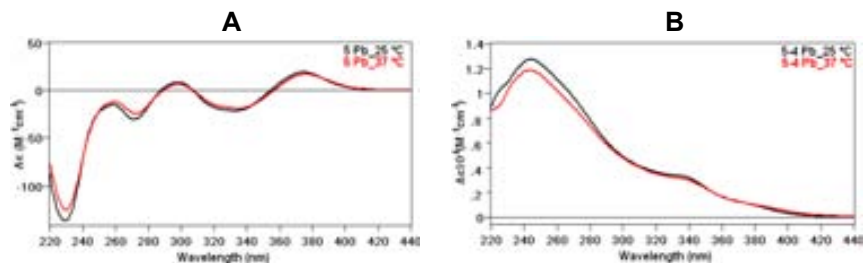


Figura 133. Comparación de los espectros de (A) DC y (B) dif. UV-vis del 5° eq de Pb (II) añadido en las valoraciones de una solución 20 μM de $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ a pH 7.0, a 25 y 37 °C.

El conjunto de los resultados obtenidos de los espectros de DC y UV-vis, revelan la coordinación de los iones Pb(II) a $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ y las especies formadas, tanto a pH 4.5 como a pH 7.0, pueden ser $Pb_{5,6}Zn_y\text{-}\alpha\text{MT3}$, donde $y = 0-4$.

2.3.2.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS

Los experimentos realizados mediante ESI-MS se llevaron a cabo siguiendo dos metodologías: añadiendo la misma cantidad de Pb(II) que el contenido de Zn(II) inicial; y añadiendo un gran exceso de Pb(II). En un primer estudio se llevó a cabo la adición de 4 eq de Pb(II) a una solución 20 μM de $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ a 25 °C y pH 7.0. En otro experimento similar, se añadieron 16 eq de Pb(II) a la misma proteína bajo las mismas condiciones experimentales. Estas muestras fueron analizadas a lo largo de 12 horas con el fin de observar la evolución de las especies formadas.

El análisis de los espectros registrados al añadir 4 eq de Pb(II) a la solución proteica muestra que estos iones provocan la formación de especies de Pb(II), tanto homometalicas como heterometalicas $Pb,Zn\text{-}\alpha\text{MT3}$, como se puede observar en la Fig. 134. En el primer espectro se observó que la especie inicial $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ sigue siendo la más abundante, mientras que las especies $Zn_3\text{-}$, $Pb_2Zn_1\text{-}$, $Zn_1\text{-}$, $Pb_1Zn_2\text{-}$, $Pb_3\text{-}$ y $Pb_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ son menos intensas (éstas dos últimas casi desapercebidas), además de la formación de la especie apo- αMT3 .

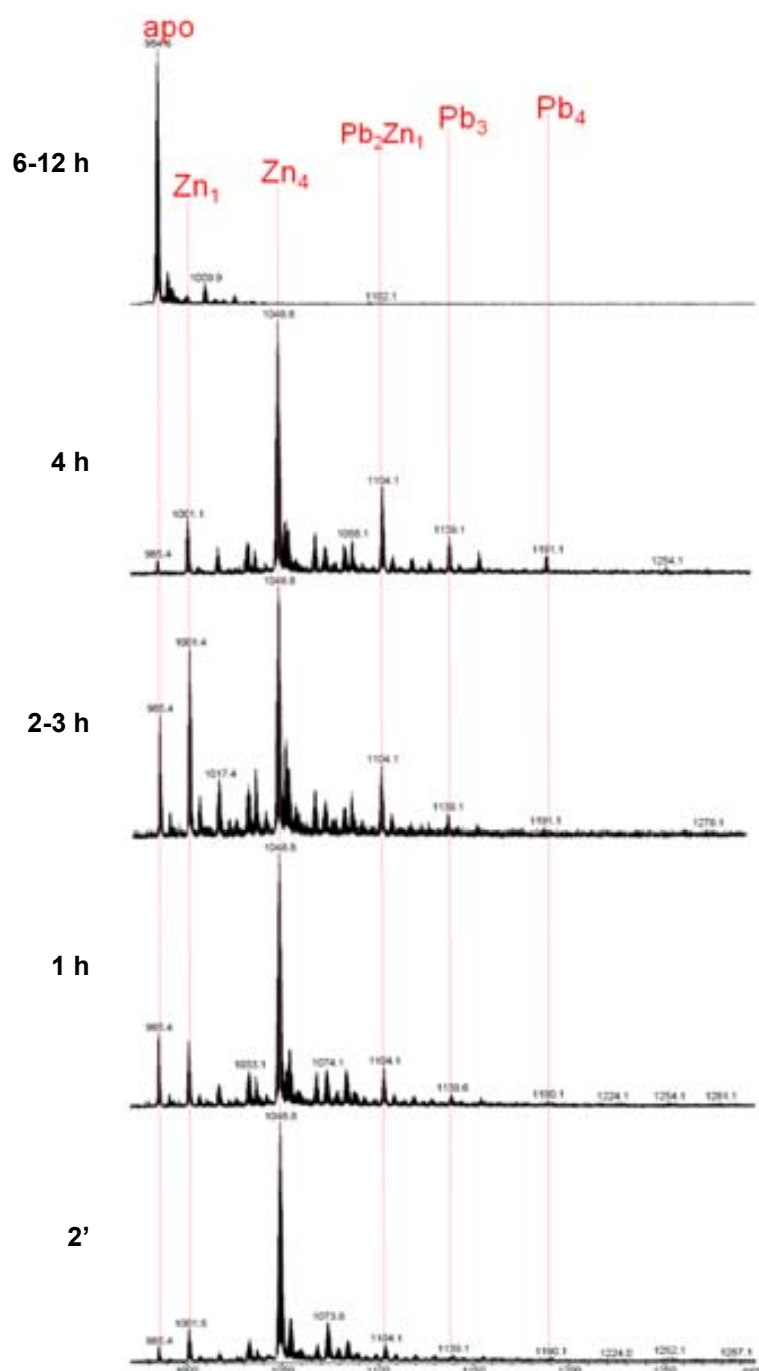
$Zn_4\text{-}\alpha\text{MT3} + 4 \text{ eq Pb(II)}$ 

Figura 134. Espectros de ESI-MS registrados durante 12 horas que muestran la evolución de una solución $20 \mu\text{M}$ de $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT3}$, a pH 7.0 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$, tras la adición de 4 eq de Pb(II) . Los espectros muestran el estado de carga +4, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

A partir de los 40 minutos de reacción se observó un leve aumento de la intensidad de la mayoría de las especies formadas anteriormente (apo-, $Zn_1\text{-}$, $Pb_2Zn_1\text{-}$, $Zn_2\text{-}$, $Zn_3\text{-}$ y $Pb_3\text{-}\alpha\text{MT3}$), mientras que la especie inicial $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ se mantiene estable hasta las 4 horas, siendo la más intensa. Al cabo de 4 horas, las especies apo- y $Zn_1\text{-}\alpha\text{MT3}$ disminuyen, pero las otras especies se mantienen estables. Tras 6 horas de reacción, la

especie más intensa es la apo- α MT3 y hay una mínima fracción de Zn₁- α MT3 (con sus aductos de amonio), que se mantienen hasta las 12 horas, mientras que la especie inicial Zn₄- α MT3 y las otras especies han desaparecido.

Zn₄- α MT3 + 16 eq Pb(II)

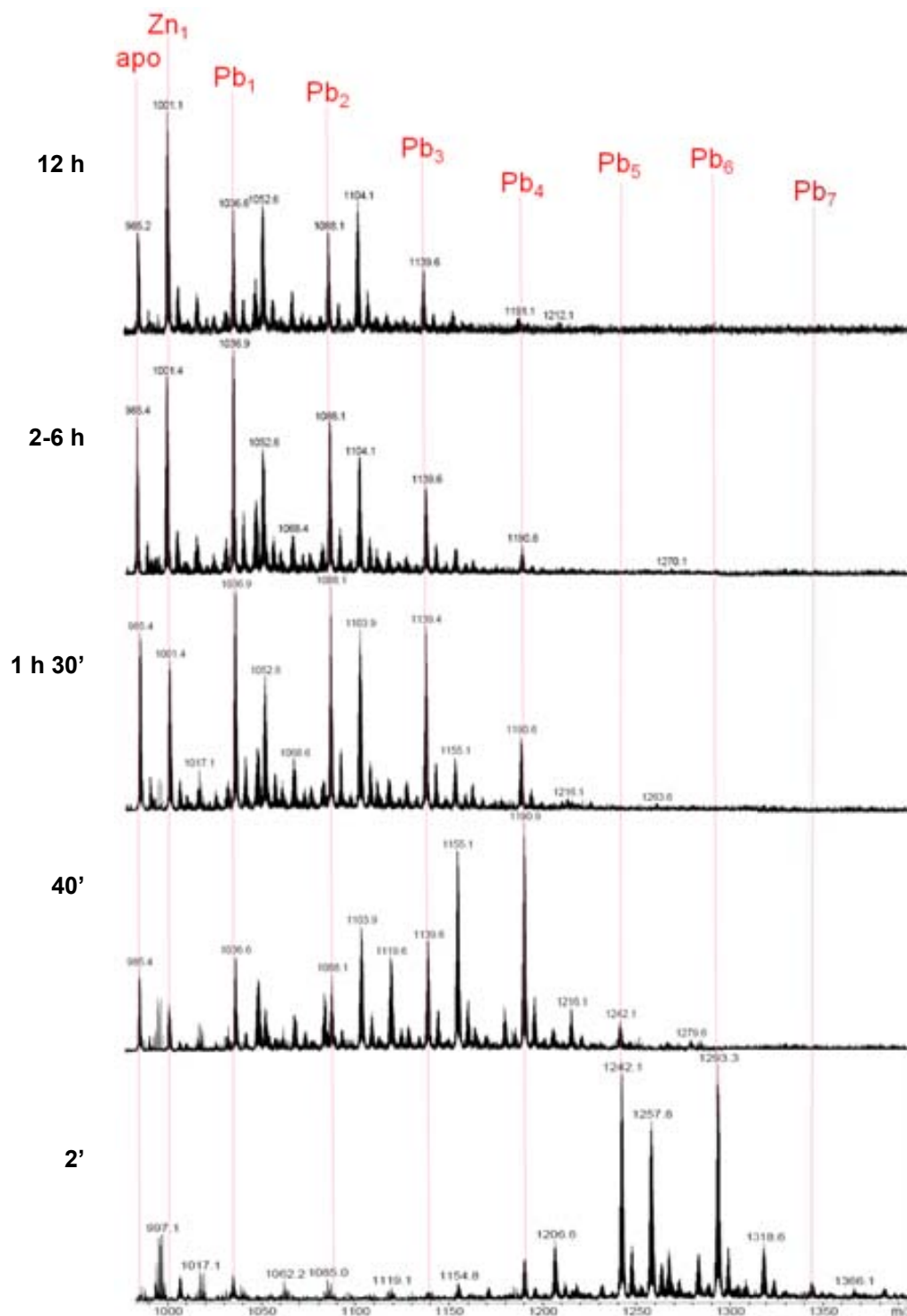


Figura 135. Espectros de ESI-MS registrados durante 12 horas que muestran la evolución de una solución 20 μ M de Zn₄- α MT3, a pH 7.0 y 25 °C, tras la adición de 16 eq de Pb (II). Los espectros muestran el estado de carga +4, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

En el segundo experimento, al añadir un exceso de 16 eq de Pb(II) a la proteína Zn₄- α MT3 se observó en los espectros de masa s registrados (Fig. 135), la formación de especies tanto homo- y heterometálicas Pb,Zn- α MT3. Las especies más abundantes son homometálicas de Pb₅⁻ y Pb₆⁻ seguidas por la especie mixta Pb₅Zn₁- α MT3. Siguen en orden de intensidad Pb₄Zn₁⁻, un aducto de amonio de Pb₆Zn₁⁻ y Pb₄- α MT3, y por último las especies Pb₇⁻, Pb₃Zn₁⁻ y Pb₃- α MT3. Al cabo de 40 minutos de reacción desaparecen la mayoría de las especies más abundantes dando lugar a unas de menor contenido metálico desde Pb₄⁻ hasta Pb₁- α MT3 y especies mixtas, además de la especie apo- α MT3. A medida que avanza el tiempo (tras 1h 30'), la especie Pb₄- α MT3 se hace cada vez menos intensa y las especies de Pb₃⁻, Pb₂⁻ y Pb₁- α MT3 y sus correspondientes especies mixtas Pb₃Zn₁⁻, Pb₂Zn₁⁻ y Pb₁Zn₁- α MT3 son más abundantes. Entre las 2 y 6 horas de reacción la mayoría de las especies se mantienen estables, y a las 12 horas la especie Zn₁⁻ sigue siendo la más intensa, pero las especies de Pb₁⁻ y Pb₂- α MT3 y sus correspondientes mixtas Pb₁Zn₁⁻ y Pb₂Zn₂- α MT3 intercambian en orden, siendo éstas últimas levemente más intensas.

2.3.2.3. Estudio por microcalorimetría, ITC

Se realizó un experimento por ITC en condiciones análogas a las fijadas estándar para el estudio por espectroscopía; solución 20 μ M de Zn₄- α MT3, pH 4.5 y 25 °C y se añadió consecutivamente los iones Pb(II) hasta completar la saturación de la proteína.

$K \times 10^{-5}$	ΔG (cal/mol)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/molK)	N (Eq de Pb(II))
5.11 \pm 0.58	-7779	-7249 \pm 98	1.85	3.44 \pm 0.03

Tabla 31. Datos termodinámicos obtenidos a partir del experimento de ITC de la valoración de Zn₄- α MT3 a 20 μ M, a pH 4.5 y 25 °C, con Pb(II). El resultado de ΔG se ha obtenido a partir de la fórmula $\Delta G = -RT \ln K$.

Los resultados obtenidos de esta valoración por ITC (Fig. 136, Tabla 31) muestran que el proceso de sustitución de los iones Zn(II) por Pb(II) es termodinámicamente favorable, con un ΔG de -7779 cal/mol, a su vez se observó una diferencia de entropía (ΔS) de 1.85 cal/molK que revela un mayor desorden de los nuevos clústeres de Pb(II) formados que los anteriores de Zn(II), además la diferencia de entalpía ΔH de -7249 cal/mol indica un proceso exotérmico. El número de equivalencia (N) nos muestra una coordinación de aproximadamente 4 iones Pb(II) (3.44 \pm 0.03). La curva experimental y la teórica no coinciden antes de la adición del 2° eq de Pb(II), indicando que existe otro proceso en la primeras incorporaciones de Pb(II) a la proteína, por lo tanto estos sitios no son idénticos. Este número de iones coincide con lo observado en los espectros de

DC (Fig. 126A) en estas mismas condiciones, que muestran que hasta el 4° eq de Pb(II) la proteína sigue un proceso totalmente isodicroico manteniendo tres puntos en común y una huella espectral que sólo varía en su intensidad a medida que aumentan los iones Pb(II). En los espectros de diferencia de UV-vis desde el 2° al 5° eq de Pb(II) se observan las mismas absorciones, por lo que coincide con los cuatro sitios de coordinación que ha revelado el ITC.

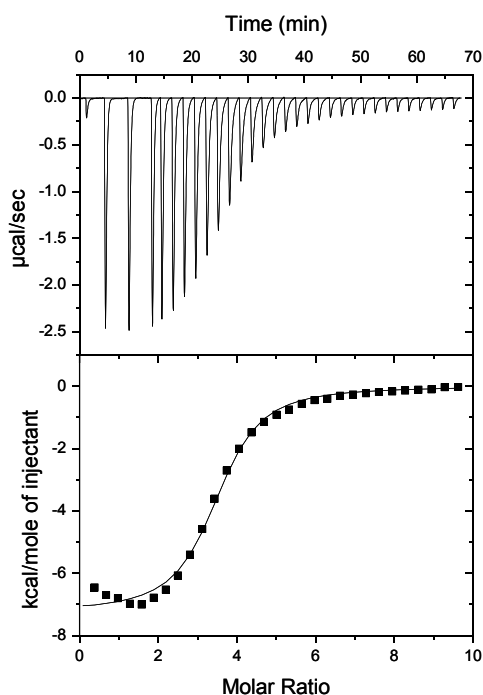


Figura 136. Termograma (arriba) y representación del calor desprendido (abajo) frente a los equivalentes de Pb(II) añadidos a una solución 19.99 μ M de Zn₄- α MT3 a pH 4.5 y 25 °C, de acuerdo con la metodología descrita en los apartados III y IV-2.

2.3.3. Dominio β MT3

2.3.3.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis

El presente estudio de la habilidad coordinante de Zn₃- β MT3 frente a Pb(II), se ha llevado a cabo mediante valoraciones con Pb(II) en diferentes condiciones experimentales (Tabla 32) registradas por espectroscopía de DC y UV-vis.

Concentración (μ M)	Temperatura (°C)	pH	
20	25	4.5	7.0
	37	7.0	

Tabla 32. Condiciones experimentales de las valoraciones de Zn₃- β MT3 con Pb(II) para el estudio espectroscópico de DC y UV-vis.

El primer análisis se realizó sobre la valoración en las condiciones estándar de trabajo: una solución 20 μ M de proteína, pH 4.5 y 25 °C. Luego se comparará con los resultados al variar el pH a 7.0 y por último, se analizarán los experimentos en condiciones similares a las fisiológicas (37 °C y pH 7.0).

El análisis de la valoración de Zn_3 - β MT3 frente a Pb(II) en condiciones estándar, evidencian la coordinación de Pb(II) a este dominio provocando la aparición de nuevas absorciones poco intensas y definidas en los espectros de DC y UV-vis (Fig. 137, Tabla 33), diferentes a las observadas para Zn -MT3 y Zn_4 - α MT3 en presencia de Pb(II). Estas señales revelan una baja estructuración de los clústeres Pb- β MT3.

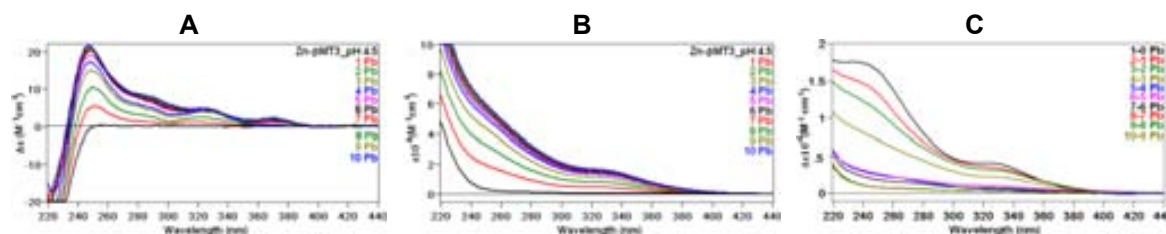
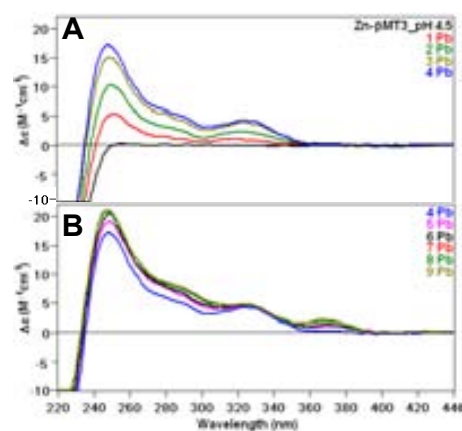


Figura 137. Espectros de (**A**) DC, (**B**) UV-vis y (**C**) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μ M de Zn_3 - β MT3 a pH 4.5 y 25 $^{\circ}$ C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

DC	UV-vis	dif. UV-vis
250(+), 290(+), 330(+), 375(+) nm	260, 335 nm	260, 335 nm

Tabla 33. Absorciones correspondientes a los espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis de la valoración de una solución 20 μ M de Zn_3 - β MT3 a pH 4.5 y 25 $^{\circ}$ C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .



Los espectros de DC (Fig. 138A) muestran las siguientes absorciones: una intensa a 250(+) nm con un hombro a 285(+) nm, y otra menos intensa a 325(+) nm que aumentan desde el 1 $^{\circ}$ hasta el 4 $^{\circ}$ eq de Pb(II) añadido. La adición del 5 $^{\circ}$ eq de Pb(II) (Fig. 138B) provoca la aparición de una nueva absorción a 375(+) nm.

Figura 138. Evolución de los espectros de DC (**A**) del 1 $^{\circ}$ -4 $^{\circ}$ y del (**B**) 4 $^{\circ}$ -9 $^{\circ}$ eq de Pb(II) añadido en la valoración de una solución 20 μ M de Zn_3 - β MT3 a pH 4.5 y 25 $^{\circ}$ C con máx. t_{est} .

En los espectros de UV-vis (Fig. 137B) se observaron dos absorciones a 260 y 335 nm, como las de *tipo II*, y los espectros de dif. UV-vis (Fig. 137C) muestran las mismas absorciones desde el 1 $^{\circ}$ hasta el 4 $^{\circ}$ eq de Pb(II) incorporado a Zn_3 - β MT3, indicando que el sitio de coordinación de estos iones en la proteína es idéntico. La adición de más equivalentes de Pb(II) no provocan una mayor contribución de las señales.

Tal y como se pudo observar en los espectros de DC y UV-vis, la saturación de las señales espectroscópicas se da a partir del 4 $^{\circ}$ eq de Pb(II) añadido, así también en la

gráfica de Abs. vs. número de eq de Pb(II) añadidos (Fig. 139) se muestra un punto importante para los 4 iones plomo(II).

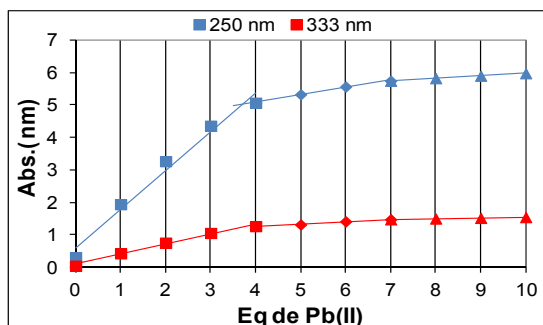


Figura 139. Variación de la absorción a una λ determinada a 250 (línea azul) y 333 (línea roja) nm vs. el número de equivalentes de Pb(II) añadidos a lo largo de la valoración de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT3 con Pb(ClO₄)₂, a pH 4.5 y a 25 °C.

Así también, en la valoración de Zn₃- β MT3 con Pb(II) en condiciones estándar, pero variando el pH a 7.0, se observan espectros similares al experimento anterior (Fig. 140), aunque la evolución por equivalente de Pb(II) añadido es diferente, apareciendo todas las absorciones desde el 1º eq de Pb(II), incluyendo la de 375(+) nm. Los espectros de DC y UV-vis se saturan a partir de la adición del 4º eq de Pb(II), al igual que en condiciones de pH 4.5.

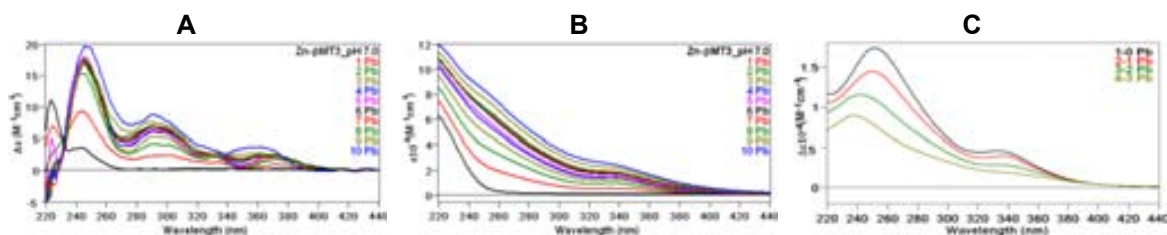


Figura 140. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT3 a pH 7.0 y 25 °C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 140A) muestran a partir del 2º eq de Pb(II) añadido la aparición de cuatro absorciones 250, 300, 330 y 375 nm y aumentan en intensidad hasta la entrada del 4º eq de Pb(II).

En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 140C) las absorciones son de *tipo II*, similares desde la adición del 1º hasta el 4º eq de Pb(II), indicando que estos iones plomo se incorporan a este dominio en sitios de coordinación equivalentes.

Tras comparar ambas valoraciones, se pudo observar que la mayor diferencia se da en la evolución de las absorciones de DC (Fig. 141), en donde a pH 4.5 no aparece la última absorción hasta el 4º eq de Pb(II), al contrario de lo que sucede a pH 7.0. A partir del 5º eq de Pb(II) añadido algunas señales de DC son similares. Esto indica que el pH tiene una influencia en la geometría de coordinación de Pb- β MT3.

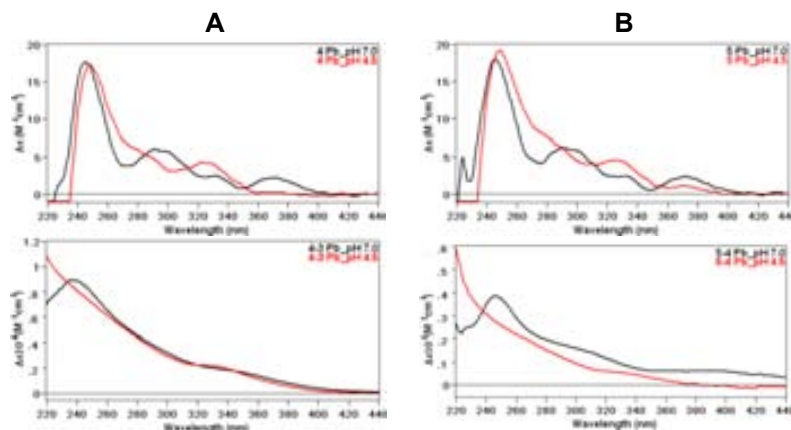


Figura 141. Comparación de los espectros de DC (arriba) y UV-vis (abajo) del (A) 4° y (B) 5° eq de Pb(II) de las valoraciones de una solución 20 μM de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT3}$ a pH 7.0 y 4.5, a 25 °C

Por otra parte, en la valoración con Pb(II) de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT3}$ en condiciones semejantes a las fisiológicas, pH 7.0 y 37 °C (Fig. 142), se observaron absorciones análogas a las obtenidas en la valoración a 25 °C. Las señales espectroscópicas de DC (Fig. 142A) se saturan a partir del 4° eq de Pb(II) añadido, pero la adición del 8° eq de Pb(II) provoca un aumento de la intensidad de la señal a 245 nm. En los espectros de UV-vis (Fig. 142B) se da una primera saturación tras la incorporación del 3° eq de Pb(II). En ambos espectros las absorciones entre 220 y 340 nm aumentan en intensidad. En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 142C) se observan las absorciones a 260 y 340 nm para el 1° y 2° eq de Pb(II) añadido, y mientras que para el 3° eq de Pb(II) éstas son menos intensas.

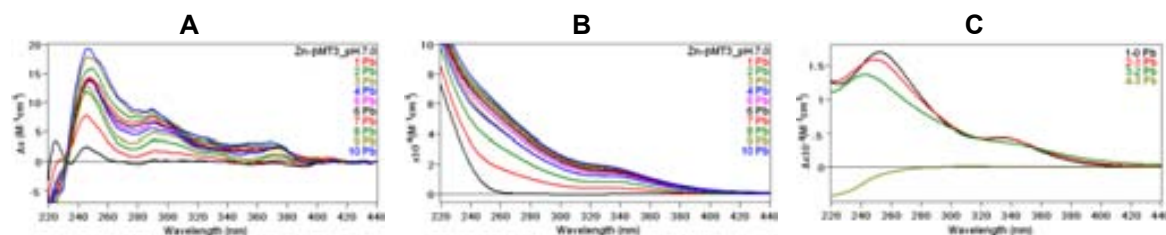


Figura 142. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μM de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT3}$ a pH 7.0 y 37 °C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Al comparar los correspondientes espectros de DC y de dif. UV-vis (Fig. 143) de las valoraciones a 25 y 37 °C a pH 7.0 se observó que la temperatura no afecta la saturación y la estructuración de la proteína, y sólo se diferencian en que la incorporación del 4° eq de Pb(II) a $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT3}$ a 37 °C no contribuye a formar nuevos agregados Pb- βMT3 , tal y como se muestra en el espectro de dif. UV-vis.

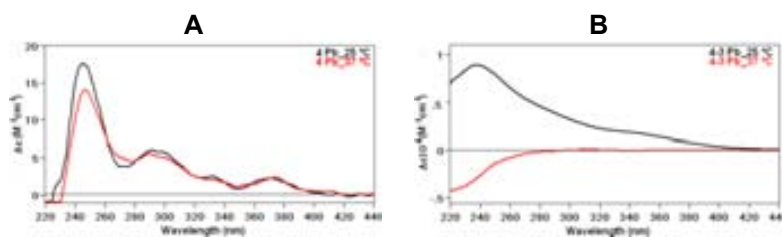


Figura 143. Comparación de los espectros de (A) DC y (B) UV-vis del 4° eq de Pb(II) añadido en las valoraciones de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT3 a pH 7.0, a 25 y 37 °C.

En todas las valoraciones la incorporación de los iones Pb(II) a Zn₃- β MT3 tienen t_{est} cortos, entre 20 minutos y 1 hora aproximadamente.

2.3.3.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS

Los experimentos realizados mediante ESI-MS se llevaron a cabo siguiendo dos metodologías: añadiendo la misma cantidad de Pb(II) que el contenido de Zn(II) inicial; y añadiendo un gran exceso de Pb(II). En un primer estudio se llevó a cabo la adición de 3 eq de Pb(II) a una solución 20 μ M de Zn₃- β MT3 a 25 °C y pH 7.0. En otro experimento similar, se añadieron 12 eq de Pb(II) a la misma proteína bajo las mismas condiciones experimentales. Estas muestras fueron analizadas a lo largo de 12 horas con el fin de observar la evolución de las especies formadas.

El análisis de los resultados obtenidos en estas condiciones muestra que la adición de 3 eq de Pb(II) a la solución proteica da lugar a la formación de especies de Pb(II), tanto homo como heterometálicas Pb,Zn- β MT3, como se puede observar en la Fig. 144, donde en un primer momento se puede observar que la especie más abundante es la mixta Pb₁Zn₁⁻, seguida por Pb₂⁻, Pb₃- β MT3 y en menor intensidad se formaron otras especies como Pb₂Zn₁⁻, Pb₁⁻ y Zn₁⁻, Zn₂⁻, Pb₃Zn₁⁻ apo- y Zn₃- β MT3. Al cabo de 1 hora se observan las mismas especies, pero algunas varían en intensidad, manteniéndose estable Pb₁Zn₁⁻ seguida por Zn₁⁻, Pb₂⁻ y Pb₁- β MT3, entre otras. A medida que avanza el tiempo la especie Zn₁⁻ pasa a ser la más intensa, seguida por Pb₁Zn₁⁻, Zn₂⁻, Zn₃⁻ y apo- β MT3, mientras las especies de homometálicas de Pb(II) disminuyen en intensidad hasta desaparecer con el tiempo. A las 12 horas de reacción el orden de intensidades son Zn₁⁻, Zn₂⁻, Zn₃⁻ y la única especie con contenido en Pb(II) es Pb₁Zn₁- β MT3.

En el segundo experimento, al añadir un exceso de 12 equivalentes de Pb(II) a la proteína Zn₃- β MT3 se observó en los espectros de masas registrados (Fig. 145) la formación de especies tanto homo- y heterometálicas Pb,Zn- β MT3.

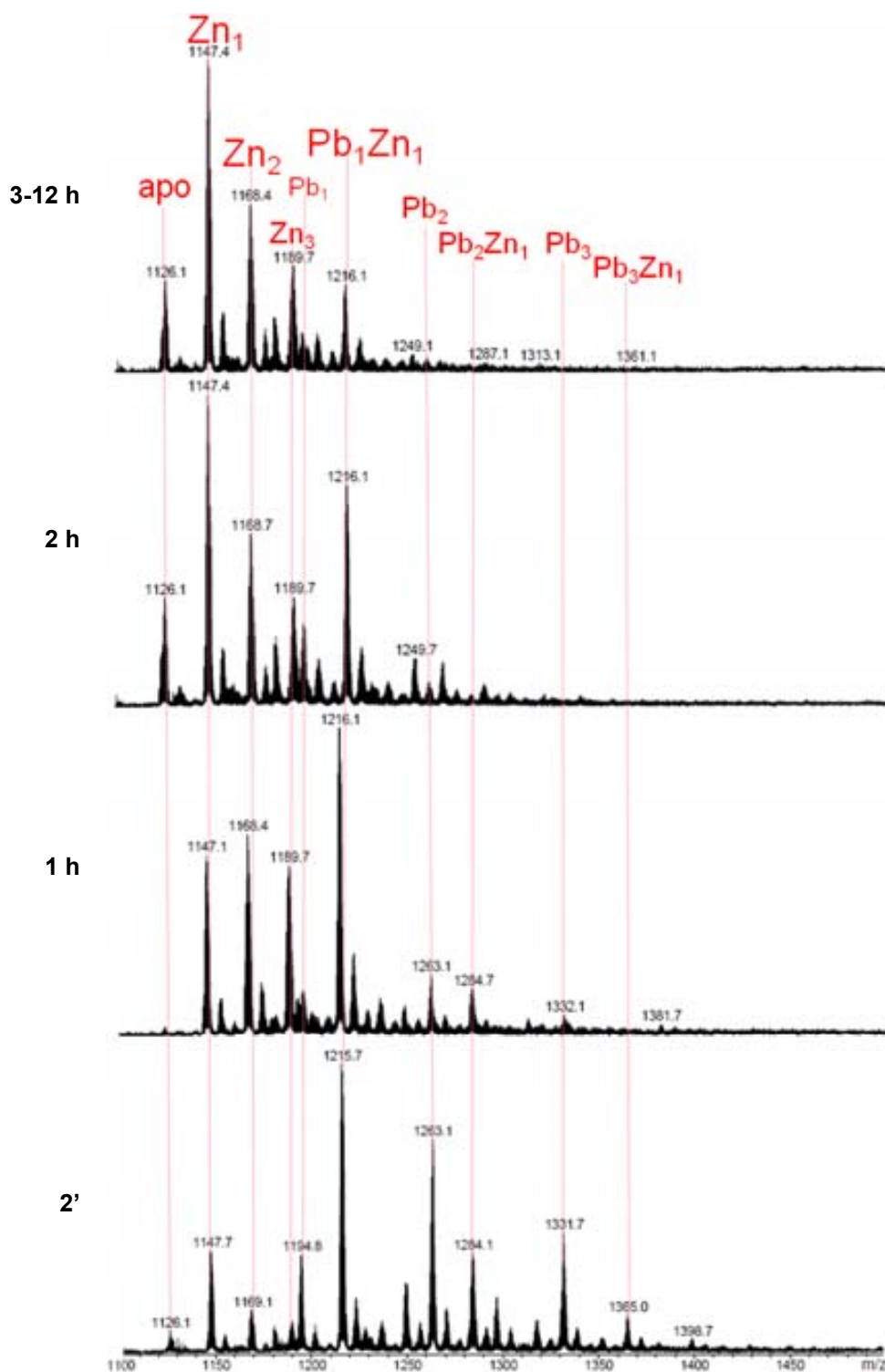
Zn₃-βMT3 + 3 eq Pb(II)

Figura 144. Espectros de ESI-MS registrados durante 12 horas que muestran la evolución de una solución 20 μM de Zn₃-βMT3, a pH 7.0 y 25 °C, tras la adición de 3 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +3, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

En un primer momento (10 min) la especie más intensa es Pb₃⁻, seguida por Pb₂Zn₁⁻, Pb₂⁻, Pb₁Zn₁⁻, Pb₄⁻, Pb₃Zn₁⁻, Pb₁⁻ y menos desapercebidas apo⁻ y Zn₁-βMT3. Al cabo de

1 hora de reacción se observan las mismas especies, pero varían algunas en intensidad como por ejemplo ahora es más intensa la especie Pb_{2-} , que la mixta Pb_2Zn_1 - β MT3.

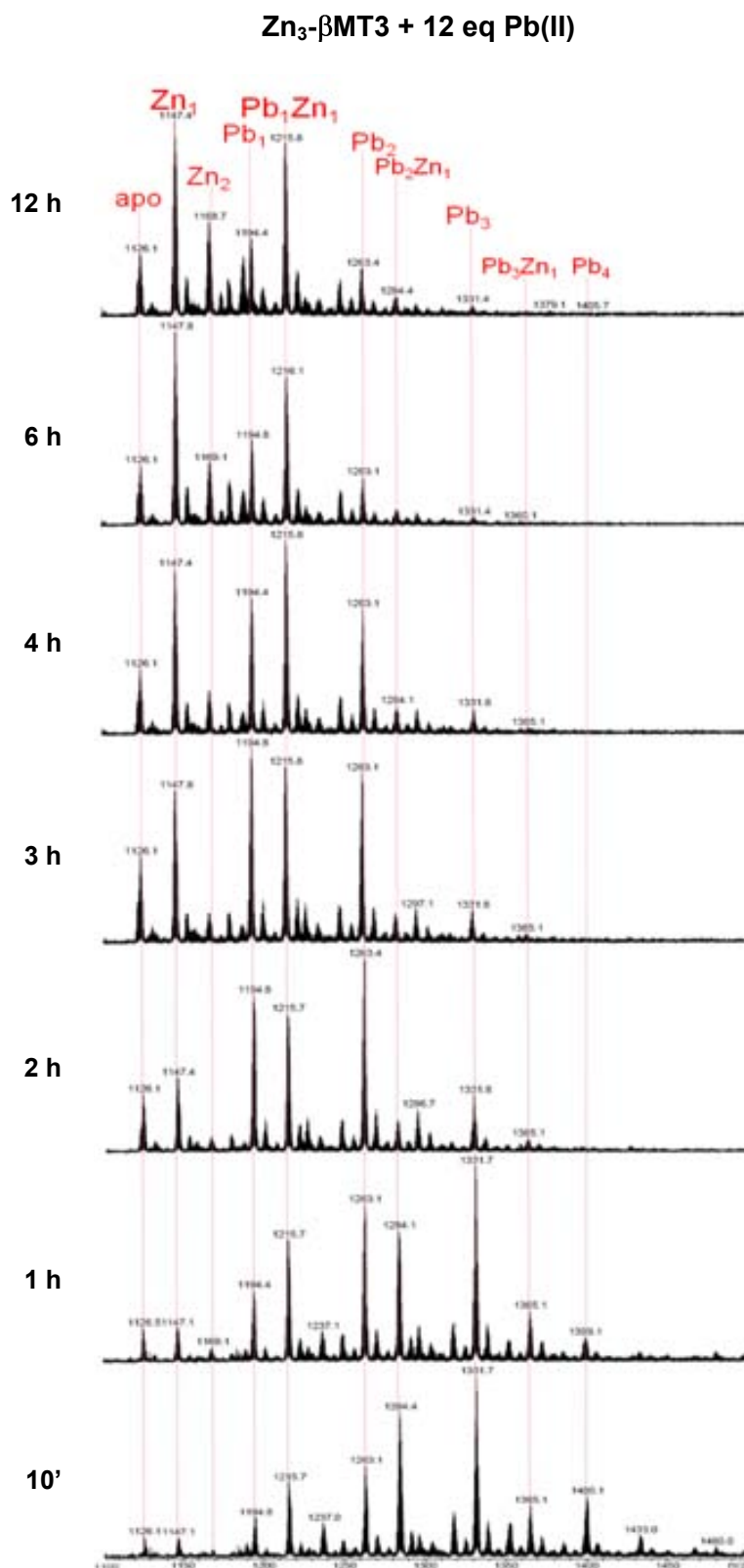


Figura 145. Espectros de ESI-MS registrados durante 12 horas que muestran la evolución de una solución 20 μ M de Zn₃- β MT3, a pH 7.0 y 25 °C, tras la adición de 12 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +3, señalando sólo las especies identificadas, obviando los correspondientes aductos de perclorato y amonio.

Tras 2 horas, la especie $Pb_3\text{-}\beta\text{MT3}$ disminuye notablemente y aumenta la homometálica $Pb_2\text{-}\beta\text{MT3}$ y así también las especies mixtas y homo con bajo número de iones como Pb_1^- y $Pb_1Zn_1^-$, Zn_1^- y la apo- βMT3 . A medida que avanza el tiempo la evolución de las especies indica que la proteína va perdiendo especies homometálicas de Pb(II) consecutivamente. A partir de las 6 horas las especies más intensas son Zn_1^- y $Pb_1Zn_1^-$ seguidas por Zn_2^- , Pb_1^- , apo- y finalmente $Pb_2\text{-}\beta\text{MT3}$, hasta las 12 horas.

2.3.3.3. Estudio por microcalorimetría, ITC

En el estudio por ITC se realizó una valoración con Pb(II) de una solución de $Zn_3\text{-}\beta\text{MT3}$ en las condiciones experimentales estándar, 20 μM de proteína, pH 4.5 y a 25 °C, hasta la saturación de la muestra.

$K \times 10^{-5}$	ΔG (cal/mol)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/molK)	N (Eq de Pb(II))
3.44 ± 0.180	-7544	-8815 ± 64	-4.16	3.53 ± 0.02

Tabla 34. Datos termodinámicos obtenidos a partir del experimento de ITC de la valoración de $Zn_3\text{-}\beta\text{MT3}$ a 20 μM , a pH 4.5 y 25 °C, con Pb(II). El resultado de ΔG se ha obtenido a partir de la fórmula $\Delta G = -RT \ln K$.

Los resultados obtenidos de la valoración por ITC (Fig. 146, Tabla 34) reveló que el proceso de intercambio de los iones Zn(I) por Pb(II) es favorecido termodinámicamente, con un ΔG de -7544 cal/mol, así también la diferencia de entropía (ΔS) de -4.16 cal/molK indica que los nuevos clúster de Pb(II) presentan un mayor orden que los de Zn(II). Además la diferencia de entalpía (ΔH) de -8815 cal/mol revela un proceso exotérmico.

El número de equivalencia (N) está entre 3 y 4 iones Pb(II) (3.53 ± 0.02), cuyos sitios de coordinación en la proteína son idénticos, ya que al comparar la curva teórica con la experimental estas coinciden. Estos resultados se pueden relacionar con los observados anteriormente por los espectros de DC y UV-vis en donde las señales se saturan a partir del 3° o 4° eq de Pb(II) añadido.

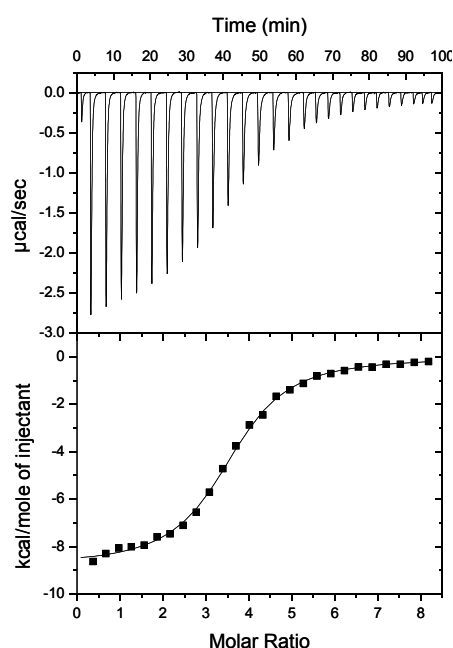


Figura 146. Termograma (arriba) y representación del calor desprendido (abajo) frente a los equivalentes de Pb(II) añadidos a una solución 20.23 μM de $Zn_3\text{-}\beta\text{MT3}$ a pH 4.5 y 25 °C, de acuerdo con la metodología descrita en los apartados III y VI-2.

Así también en los espectros de ESI-MS al añadir un exceso de Pb(II) a la proteína, se observan las especies $Pb_4\text{-}\beta\text{MT3}$ y $Pb_3\text{-}\beta\text{MT3}$, ésta última es la más abundante desde el inicio de la reacción hasta 1 hora.

2.3.4. Análisis global del estudio de la habilidad coordinante de la isoforma MT3 y sus dominios α y β frente a Pb(II)

Así el conjunto de resultados obtenidos en los espectros de DC, UV-vis y ESI-MS, además de la valoración por ITC, indican que al adicionar los iones Pb(II) a $Zn_7\text{-MT3}$, y sus dominios $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ y $Zn_3\text{-}\beta\text{MT3}$, éstos se coordinan a las proteínas provocando la aparición de absorciones características correspondientes al enlace de Pb-MT3.

La isoforma MT3 frente a Pb(II) muestra una huella espectral diferente a las observadas para MT1 y MT2 en presencia de plomo(II). Las señales de DC siguen un proceso isodicroico, revelando que probablemente los complejos Pb-MT3 se forman de manera cooperativa, es decir, que hay una evolución del agregado inicial al fin al sin formación de especies intermedias. La saturación de las señales espectroscópicas se da a partir del 6° eq de Pb(II) añadido a pH 4.5, mientras que a pH 7.0 se da una parcial para el 6° eq de Pb(II) y total para el 10° eq de Pb(II) adicionado. Los enlaces Pb-MT3 provocan la aparición de absorciones de *tipo II* a pH ácido y neutro, revelando un sólo entorno de coordinación de los iones Pb(II). Así también, por ITC se obtiene un número de equivalencia para 6 iones Pb(II) que ocupan sitios de unión idénticos dentro de la proteína, esto es comparable al primer punto de saturación.

Los espectros de masas revelan la formación de especies homo y heterometálicas de Pb(II), desde $Pb_1Zn_6\text{-}$ hasta $Pb_{11}\text{-MT3}$ (y en exceso hasta $Pb_{12}\text{-}$). Los clústeres más abundantes son $Pb_8Zn_1\text{-}$, $Pb_9\text{-}$ y $Pb_{10}\text{-MT3}$, y además se observan las especies $Pb_6Zn_1\text{-}$ y $Pb_6Zn_2\text{-MT3}$, con gran estabilidad a lo largo del tiempo (24 horas). La proteína en presencia de exceso de Pb(II) aumenta su capacidad para enlazar éstos iones.

En $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ la adición de plomo(II) provocó la aparición de absorciones características que revelan la coordinación de Pb(II) en el dominio. Estas señales de DC siguen un proceso isodicroico y la evolución espectral muestra que, mientras unas bandas desaparecen, otras nuevas aparecen. La saturación de $Zn_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ se da a partir del 6° eq de Pb(II) añadido, tanto a pH 4.5 y como a pH 7.0. Los enlaces de los nuevos clústeres $Pb\text{-}\alpha\text{MT3}$ provocan la aparición de absorciones diferentes al *tipo I y II* (250, 340 y 380 nm). Por ITC se observó un número de equivalencia aproximado a 4 iones plomo, pero con más de un sitio de unión de Pb(II) a la proteína, probablemente siendo el 1° eq de Pb(II) enlazado de manera diferente, como se puede ver en los espectros de

dif. UV -vis. Los espectros de masas muestran la formación de especies homó y heterometálicas de Pb(II) y Zn(II), además de la presencia de la apo-MT como una de las más abundantes. Mientras que en exceso de Pb(II) se observan los clústeres desde Pb_1 - hasta Pb_6 - α MT3, siendo las más abundantes en un comienzo Pb_5 - y Pb_6 -, y al final Zn_1 - α MT3. Esto revela que este dominio en presencia de Pb(II) libera casi todos los iones de Zn(II) coordinados inicialmente.

El dominio Zn_3 - β MT3 en presencia de los iones plomo(II) presenta absorciones características de la estructuración de la proteína frente a este metal, la huella espectral no sigue un proceso isodicroico y no aparecen máximos y mínimos como en las otras MTs frente a Pb(II), revelando una baja quiralidad de las especies Pb - β MT3 formadas. El enlace Pb - β MT3 refleja absorciones similares a las de *tipo II*, 260 y 335 nm, indicando un sólo sitio de coordinación, semejante al clúster $Pb-S_3$ con una geometría piramidal trigonal. La saturación de este dominio se da a partir del 4° eq de Pb(II) añadido a pH 4.5 y 7.0. Esto se corrobora con lo observado por ITC que revela un número de equivalencia aproximado a 4 iones Pb(II) y cada uno de ellos con sitios de unión idénticos dentro de la proteína. Los espectros de masas muestran en un inicio la formación de los clústeres Pb_3 - y Pb_4 - β MT3 y finalmente las más abundantes son apo-, Zn_1 -, Zn_2 -, Pb_1Zn_1 - β MT3, esto revela que no tiene mucha capacidad coordinante para enlazar Pb(II) y sólo se observa la presencia de un ión Pb(II), aún en presencia de un exceso de plomo.

Finalmente, el estudio de la habilidad coordinante de la isoforma MT3 de mamífero y sus fragmentos α y β frente a Pb(II) muestran que éstos se comportan de manera dependiente en la proteína entera. El dominio Zn_4 - α MT3 tiene una mayor estructuración y capacidad coordinante frente a Pb(II), que se refleja en un mayor tiempo de estabilización de los iones plomo incorporados. Mientras que Zn_3 - β MT3 presenta una baja estructuración y menor capacidad para enlazar Pb(II), con t_{est} de los eq de Pb(II) cortos. En MT3, el dominio α sería el más dominante, ya que tiene una alta capacidad para coordinar los iones Pb(II).

2.4. Habilidad coordinante de la isoforma MT4 de mamífero frente a Pb(II)

2.4.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis

En este apartado se analizarán y discutirán los resultados obtenidos en las valoraciones de Zn₇-MT4 con Pb(II) en diferentes condiciones experimentales registradas por DC y UV-vis, que se muestran en la Tabla 35.

Concentración (μ M)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	pH
10	25-37-55	4.5
	37	7.0
	55	

Tabla 35. Condiciones experimentales de las valoraciones de Zn₇-MT4 con Pb(II) para el estudio espectroscópico de DC y UV-vis.

La primera valoración de Zn₇-MT4 frente a Pb(II) se realizó en condiciones estándar de trabajo: una solución 10 μ M de proteína, a pH 4.5 y 25 $^{\circ}$ C, pero la temperatura se modificó a lo largo de la valoración para que la incorporación de los iones Pb(II) fuese más rápida.

El análisis de los resultados espectroscópicos (Fig. 147, Tabla 36), reveló que los t_{est} por eq de Pb(II) eran largos, así que se decidió aumentar la temperatura de esta valoración, primero de 25 a 37 $^{\circ}$ C, y finalmente a 55 $^{\circ}$ C, para hacer más rápida la incorporación de Pb(II) a la proteína. La coordinación de los iones Pb(II) a Zn₇-MT4 provoca que ésta se estructure de manera análoga a como lo hace Zn₇-MT1 en presencia de Pb(II).

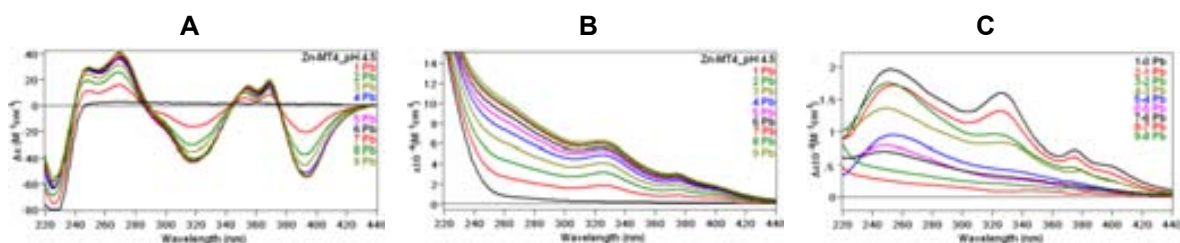


Figura 147. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT4 a pH 4.5 y 25/37/55 $^{\circ}$ C hasta 9 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

DC	UV-vis	dif. UV-vis
228(-), 246-271(+), 318(-), 358-375(+), 400(-) nm	250, 330, 375, 400 nm	250, 330, 375, 400 nm

Tabla 36. Absorciones correspondientes a los espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT4 a pH 4.5 y 37 $^{\circ}$ C hasta 9 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

En los espectros de DC (Fig. 148A) se observan un grupo de absorciones: 228(-), 246(+) y 271(+), 318(-), 358(+) y 375(+) y 400(-) nm que aumentan su intensidad (tanto positiva como negativa) a medida que se adicionan los sucesivos equivalentes de Pb(II)

generando tres puntos isodicroicos a 285, 347 y 385 nm. Así también, en los espectros de UV-vis (Fig. 148B) se observan cuatro absorciones correspondientes al enlace Pb-MT4: a 250, 330, 375 y 400 nm, asignadas como *tipo I*.

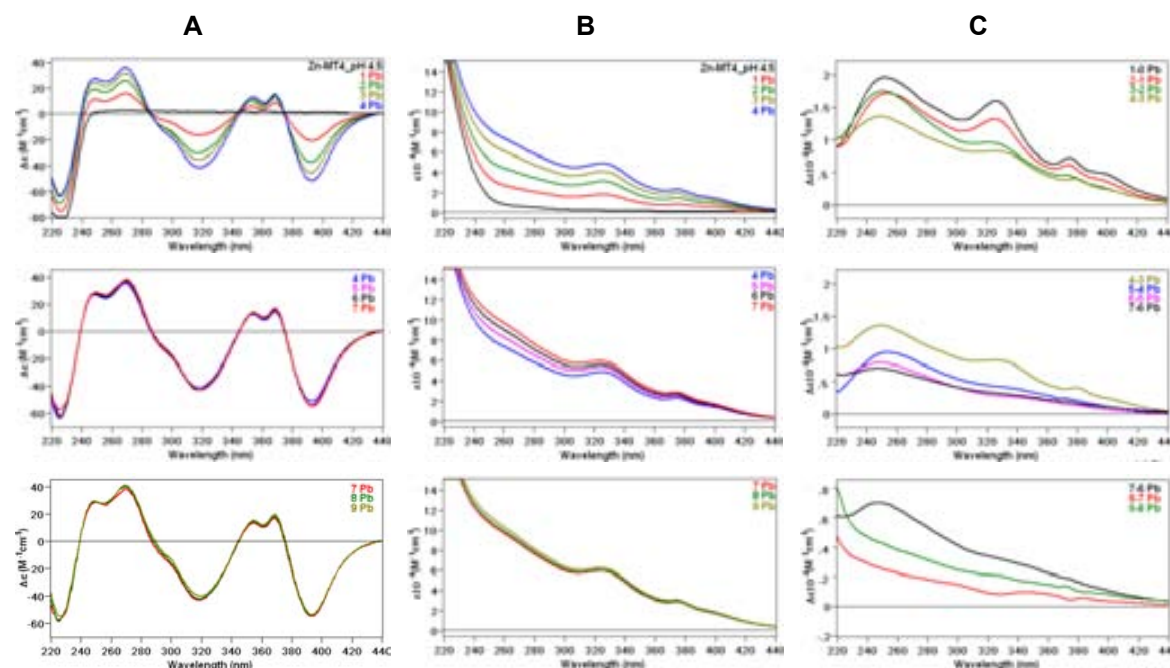


Figura 148. Evolución de los espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 10 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT4}$ a pH 4.5 y 25/37/55 $^\circ\text{C}$ (Fig. 147) en función del n° de eq de Pb(II) añadidos.

Las señales espectroscópicas de DC y UV-vis muestran que se llega a una situación de saturación parcial de la proteína para el 4° eq de Pb(II) añadido. La saturación final se consigue para el 7° eq de Pb(II). Esto podría indicar que el proceso de coordinación de los iones plomo(II) a $\text{Zn}_7\text{-MT4}$ se da en dos etapas. Esto tiene relación con lo observado en los espectros de dif. UV-vis (Fig. 148C), en donde se observan dos tipos de absorciones, las de *tipo I*; 250, 330, 375 y 400 nm, desde el 1° hasta el 4° eq de Pb(II) y luego a partir del 5° eq hasta el 7° eq de Pb(II) aparecen las absorciones de *tipo II*; una 250 y otra de 350 nm, indicando un cambio en la conformación de las especies Pb-MT4.

A diferencia de lo que sucede en la valoración a pH 4.5, cuando se valora una solución 10 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT4}$ con Pb(II) en condiciones similares a las fisiológicas, pH 7.0 y a 37 $^\circ\text{C}$ (Fig. 149), la adición de los iones plomo(II) no provoca un cambio en el espectro inicial, indicando así que este metal no se coordina a la proteína. Debido a esto se aumentó la temperatura a 55 $^\circ\text{C}$, pero no hubo ningún cambio en la huella espectral, por lo que se aumentó a 70 $^\circ\text{C}$, para facilitar el intercambio metálico, pero aún así no hubo ninguna variación. Además se añadió un exceso de iones Pb(II), ya que anteriormente se había observado un comportamiento similar en el dominio $\text{Zn}_4\text{-}$

α MT1 en presencia de Pb(II), pero al contrario a éste, en Zn₇-MT4 la adición de más iones Pb(II) no provocó la aparición de ninguna absorción, por lo tanto, el Pb(II) no se coordina a esta proteína.

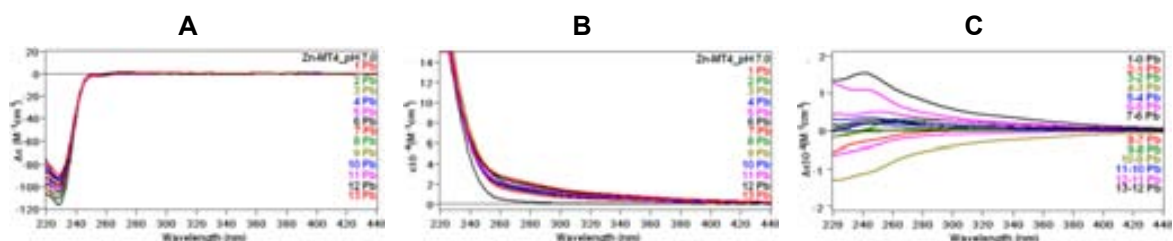


Figura 149. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT4 a pH 7.0 y 37 °C/55-70 °C hasta 13 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

2.4.2. Estudio por espectrometría de masas, ESI-MS

Se realizó un experimento mediante ESI-MS que se llevó a cabo en condiciones fisiológicas, pH 7.0 y 37 °C, con una concentración 10 μ M de Zn₇-MT4, en donde se añadieron 10 equivalentes de Pb(II) y se registró durante un máximo de 24 horas de reacción.

Zn₇-MT4 + 10 eq Pb(II)

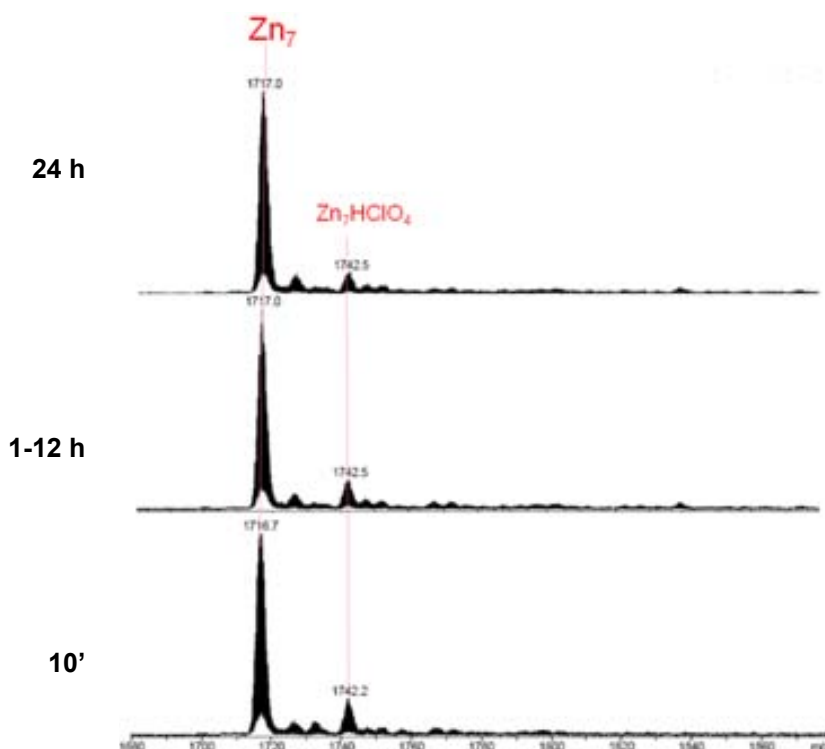


Figura 150. Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la no evolución de la solución 10 μ M de Zn₇-MT4, a pH 7.0 y 37 °C, tras la adición de 10 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +4.

Los espectros de masas registrados (Fig. 150) revelan que durante el experimento la especie de partida Zn₇-MT4 se mantiene estable y no hay formación de especies de Pb(II), ni siquiera se observan complejos heterometálicos Pb,Zn-MT4.

Estos resultados corroboran lo observado anteriormente por espectroscopía de DC y UV-vis en condiciones similares a las fisiológicas, en donde los iones Pb(II) añadidos a Zn-MT4 no provocan la aparición de nuevas absorciones, indicando que este ión no se coordina a esta proteína a pH neutro.

2.4.3. Estudio por microcalorimetría ITC

En el estudio por ITC se realizó una valoración con Pb(II) de Zn₇-MT4 para así obtener datos termodinámicos sobre el intercambio de Zn(II) por Pb(II). Para esto se prepara un experimento en las condiciones estándar de trabajo definidas para el estudio espectroscópico, es decir, una muestra de solución 10 μM de proteína a pH 4.5 y a 37 °C y se añaden consecutivamente iones Pb(II) hasta la saturación de la proteína.

K x10⁻⁵	ΔG (cal/mol)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/molK)	N (Eq de Pb(II))
2.44 ± 0.51	-7637	-5713 ± 168	6.21	10.7 ± 0.22

Tabla 37. Datos termodinámicos obtenidos a partir del experimento de ITC de la valoración de una solución 10 μM de Zn₇-MT4, a pH 4.5 y 37 °C, con Pb(II). El resultado de ΔG se ha obtenido a partir de la fórmula $\Delta G = -RT \ln K$.

El análisis de los datos obtenidos de esta valoración (Fig. 151, Tabla 37), indican que el proceso de sustitución de los iones Zn(II) por Pb(II) está termodinámicamente favorecido mostrando un ΔG de -7637 cal/mol, y también es favorable tanto entrópica como entálpicamente, en donde la diferencia de entropía (ΔS) de 6.21 cal/molK indica que la formación de los nuevos complejos Pb-MT4 presentan un mayor desorden molecular que los anteriores clústeres de Zn₇-MT4. La diferencia de entalpía (ΔH) revela una reacción exotérmica, o sea, energéticamente favorablemente. Se obtiene un número de equivalencia (N) de 10.7 ± 0.224, que no concuerda con la saturación observada por las espectroscopías de DC y UV-vis. Al comparar las curvas experimental y la teórica se observa que éstas no coinciden, ya que la forma de la curva experimental en los 4 primeros equivalentes añadidos revela que hay más de un sitio de coordinación, al igual que lo observado anteriormente en los espectros de dif. UV-vis que muestran más de un tipo de absorción dependiendo del número de iones Pb(II) añadidos (Fig. 148).

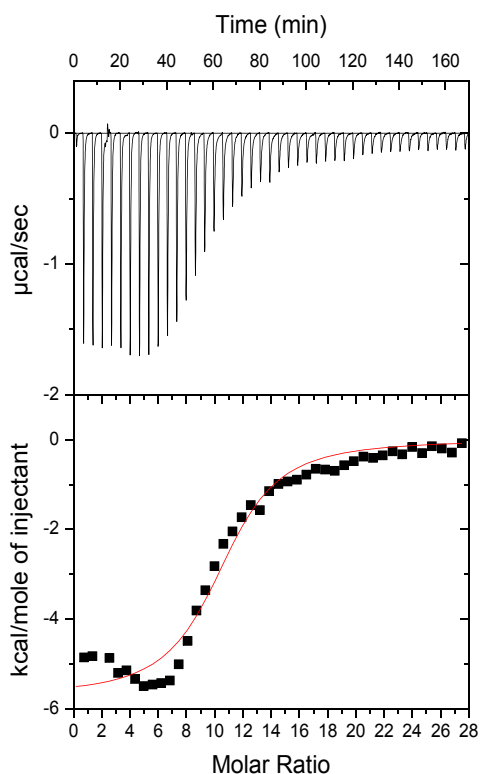


Figura 151. Termograma (arriba) y representación del calor desprendido (a bajo) frente a los equivalentes de Pb(II) añadidos a una solución 10 μ M de Zn₇-MT4 a pH 4.5 y 37 °C, de acuerdo con la metodología descrita en los apartados III y VI-2.

2.4.4. Análisis global del estudio de la habilidad coordinante de la isoforma MT4 frente a Pb(II)

El estudio de la habilidad coordinante de la isoforma MT4 de mamífero frente a Pb(II) ha mostrado que esta proteína es incapaz de enlazar plomo(II) en condiciones similares a las fisiológicas, pH 7.0 y 37 °C, prefiriendo mantenerse enlazada a Zn(II), a pesar de su carácter de Cu-tioneína. Estos resultados pueden indicar que MT4 no tiene una función de detoxificadora frente a Pb(II), sino que para poder coordinarlos necesita disminuir el pH de 7.0 a pH 4.5, donde los iones Zn(II) están más débilmente enlazados.

2.5. Habilidad coordinante de la isoforma Cup1 de levadura frente a Pb(II)

2.5.1. Estudio por espectroscopía de DC y UV-vis

Análogamente al estudio del comportamiento de las MTs de mamífero frente a Pb(II) también se ha examinado la habilidad coordinante de la isoforma de levadura, Cup1, clasificada como una Cu-tioneína por excelencia, de esta manera se pretende determinar las similitudes y diferencias de la coordinación metálica del ión Pb(II) entre las MTs estudiadas respecto al carácter de Zn- o Cu-tioneína de cada una de ellas.

De acuerdo a los antecedentes presentados anteriormente en la metodología de trabajo, se ha estudiado la preparación Zn-Cup1 en presencia de Pb(II) mediante las espectroscopías de DC y UV-vis, fijando las siguientes condiciones experimentales:

Concentración (μM)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH	
20	25	4.5	7.0
	45	4.5	
10	25	7.0	
	45	4.5	
5	25	7.0	
	45	4.5	

Tabla 38. Condiciones experimentales de las valoraciones de la preparación Zn-Cup1 con Pb(II) para el estudio espectroscópico de DC y UV-vis.

El análisis detallado de los datos espectroscópicos (Fig. 152, Tabla 39) correspondientes a la valoración de la preparación Zn-Cup1 con Pb(II) en las condiciones estándar de trabajo: concentración $20 \mu\text{M}$ de proteína, pH 4.5 y 25°C , revelan que la adición del metal provoca la aparición absorciones características de la coordinación del ión Pb(II) a la proteína.

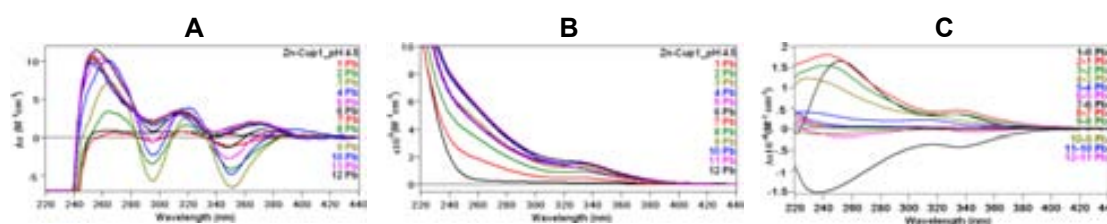


Figura 152. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis de la valoración de una solución $20 \mu\text{M}$ de Zn-Cup1 a pH 4.5 y 25°C hasta 12 eq de Pb(II) con máx. t_{est} .

Eq de Pb(II)	DC	UV-vis	Dif. UV-vis
1° - 4°	264(+), 295(-), 320(+) y 350(-), 4° :390(+) nm	260, 350 nm	243(2° - 4°)-252(1°)(+), 338(+) nm
5° - 6°	257(+), 295(+), 318(+), 348(-), 367(+) nm		227(+), 257(-)(sólo 6°), 318(+) nm
7° - 12°	253(+), 295(+), 315(+), 368(+) ancha nm		8° : 236(-), 340(-) nm

Tabla 39. Absorciones correspondientes a los espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis de la valoración de la preparación Zn-Cup1 a $20 \mu\text{M}$, pH 4.5 y 25°C hasta 12 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 153A) muestran cuatro absorciones que incrementan su intensidad isodicroica y gradualmente hasta el 3° eq de Pb(II) añadido, por medio de cuatro puntos isodicroicos 283, 310, 333 y 385 nm. La adición del 4° eq de Pb(II) provoca la aparición de una banda a 390(+) nm (Fig. 153B) y las otras señales varían de forma diferente, produciéndose un ligero desplazamiento a energías mayores de los máximos positivos. A partir del 7° eq de Pb(II) añadido (Fig. 153C) desaparecen los dos máximos negativos (295 y 350 nm) y aparece una señal positiva a 368 nm, estas variaciones espectrales sugieren la desestructuración de las especies Pb-Cup1 formadas inicialmente.

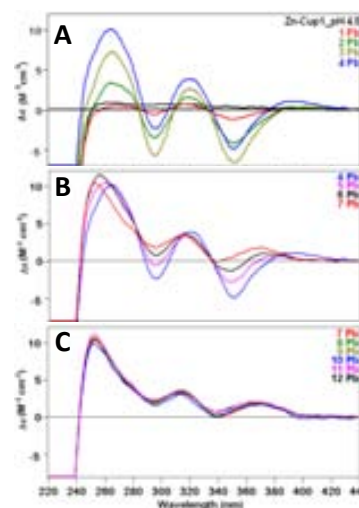


Figura 153. Evolución de los espectros de DC del (A) 1°-4°, (B) 4°-7° y (C) 7°-12° eq de Pb(II) de la valoración de la preparación Zn-Cup1 a 20 μ M, pH 4.5 y 25 °C con máx. t_{est} .

Los espectros de UV-vis (Fig. 152B) muestran un incremento de las absorciones a 240-250 y 340 nm desde el 1° hasta el 4° eq de Pb(II) añadido, asignadas anteriormente como *tipo II* que revelan posiblemente la coordinación de Pb(II) por medio 3 Cys con una geometría piramidal trigonal. A partir de la incorporación del 5° eq de Pb(II) las señales de UV-vis prácticamente no varían, si bien los espectros de dif. UV-vis muestran pequeñas pérdidas de algunos cromóforos (bandas negativas). Esto sugiere la saturación de la proteína y la posible pérdida de los iones Zn(II) inicialmente coordinados o cambios en la coordinación de Pb(II). Por lo tanto, los datos analizados podrían indicar en un inicio la formación de la especie Pb_4Zn_x -Cup1 (en la que x puede estar entre 0 y 4), que posteriormente se desestructura al añadir un exceso de Pb(II).

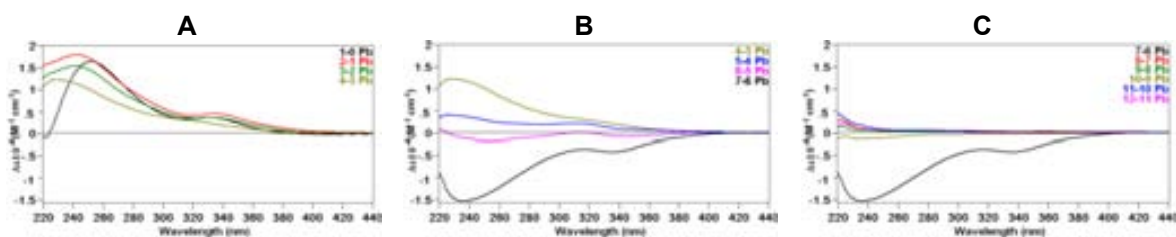


Figura 154. Espectros de dif. UV-vis del (A) 1° hasta 4°, (B) 4°-7° y (C) 7° a 12° eq de Pb(II) añadido en la valoración de la preparación Zn-Cup1 a 20 μ M, pH 4.5 y 25 °C.

Una vez evidenciada la coordinación de Pb(II) a Zn-Cup1, se realizó una valoración en condiciones análogas, pero aumentando la temperatura a 45 °C (Fig. 155). En este experimento se observó un conjunto de absorciones similares a las observadas a 25 °C y se obtuvieron t_{est} de cada equivalente de Pb(II) añadido igualmente cortos, pero aún

así se decidió trabajar a temperatura elevada para facilitar una mayor estabilización de los iones Pb(II) en Zn-Cup1.

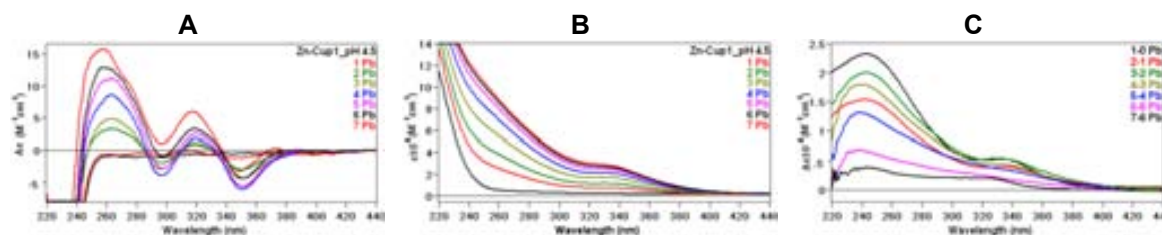


Figura 155. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de la preparación Zn-Cup1 a 20 μM , pH 4.5 y 45 $^{\circ}\text{C}$ hasta 7 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Los espectros de DC (Fig. 155A) muestran absorciones que aumentan su intensidad desde la adición del 1 $^{\circ}$ hasta el 4 $^{\circ}$ eq de Pb(II) a Zn-Cup1, manteniendo tres puntos isodicroicos 287, 307 y 334 nm. A partir del 5 $^{\circ}$ eq de Pb(II) añadido las señales se desplazan hacia arriba, mostrando una desestructuración de la proteína.

Los espectros de UV-vis (Fig. 155B) presentan las absorciones de *tipo II* análogas a las observadas en Zn-Cup1 en presencia de Pb(II) a temperatura ambiente, correspondientes a los clústeres Pb-Cup1. Estas señales se observaron en los espectros de dif. UV-vis (Fig. 156) por la contribución de los primeros cuatro equivalentes de Pb(II) añadidos.

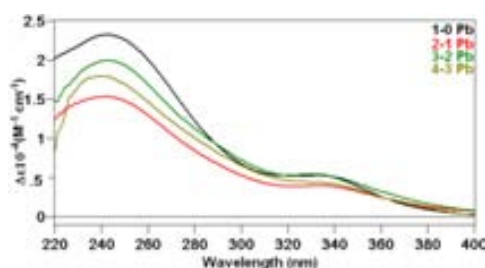


Figura 156. Espectros de dif. UV-vis del 1 $^{\circ}$ hasta el 4 $^{\circ}$ eq de Pb(II) añadido en la valoración de la preparación Zn-Cup1 a 20 μM , pH 4.5 y 45 $^{\circ}\text{C}$.

Las señales espectroscópicas de DC muestran la saturación de la proteína para el 4 $^{\circ}$ eq de Pb(II) añadido y a partir del 5 $^{\circ}$ eq de Pb(II) en el UV-vis.

Así, al comparar los resultados espectroscópicos de la interacción de Pb(II) con la preparación 20 μM de Zn-Cup1 a diferentes temperaturas, 25 y 45 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 157), se observó que las señales presentan intensidades diferentes y además varían en la evolución de los espectros a partir del 4 $^{\circ}$ eq de Pb(II) añadido.

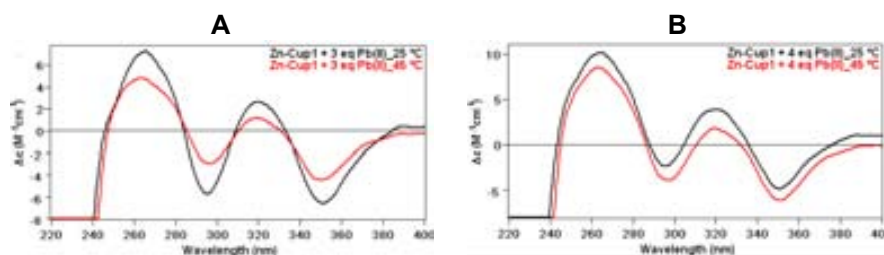


Figura 157. Comparación de los espectros de DC del (A) 3° y (B) 4° eq de Pb(II) de la valoración de una solución 20 μ M de Zn-Cup1 a pH 4.5, a 25 y 45 °C.

Así, se ha observado que la temperatura de trabajo afecta al número de eq de Pb(II) que Zn-Cup1 puede enlazar. Para $T^a=25$ °C se satura entre 3 y 4 eq de Pb(II) añadidos, mientras que a 45 °C se pueden enlazar hasta 4 y 5 iones Pb(II).

Sin embargo, la temperatura no afecta a los t_{est} para cada eq de Pb(II) añadido, siendo éstos cortos (20'-1h).

En conclusión, la variación de temperatura afecta a la saturación de las señales espectroscópicas y a la evolución de las especies Pb-Cup1 en solución a medida que se añaden los iones Pb(II) a Zn-Cup1.

Para estudiar con precisión el efecto del t_{est} en la formación de los complejos Pb_4Zn_x -Cup1 se realizó la valoración de la preparación 20 μ M de Zn-Cup1 a 25 °C y pH 4.5, se registraron sus espectros de DC y UV-vis (Fig. 158), a un tiempo inicial (líneas sólidas) y al cabo de 12 horas (líneas punteadas) desde la adición de cada equivalente de Pb(II).

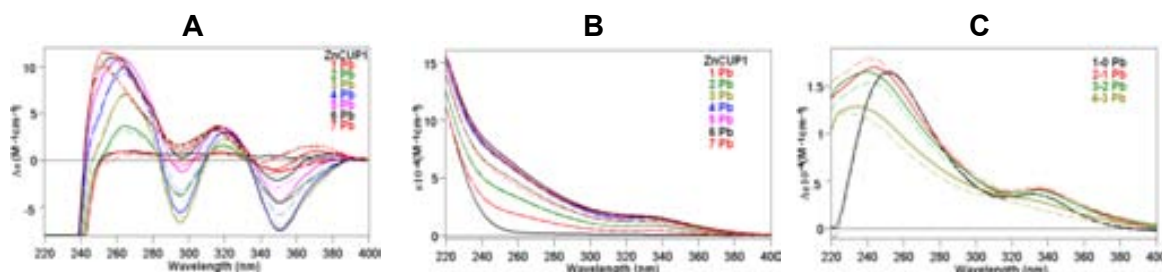


Figura. 158. Superposición de los espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis del 1° al 4° eq de Pb(II) registrados a tiempo 0 y 12 h desde la adición de cada eq de Pb(II) a una solución 20 μ M de Zn-Cup1 a pH 4.5 y 25 °C.

Como se puede observar en la Fig. 158A, los espectros de DC varían mínimamente con el tiempo con excepción de la adición del 4°, 5° y 7° eq de Pb(II) que experimentan variaciones más importantes. En cambio, los espectros de UV-vis (Fig. 158 B) son semejantes para cada eq de Pb(II) añadido. Respecto al punto de saturación, éste tiene lugar para el 4° eq de Pb(II) añadido, tanto a $t=0$ h como a $t=12$ h, indicando que los t_{est} de los iones Pb(II) no afectan a la estequiometría de las especies Pb-Cup1, pero sí a su estructuración, ya que para t_{est} largos ($t=12$ h) y en presencia de exceso de Pb(II) se observa (Fig. 159) la pérdida de cromóforos.

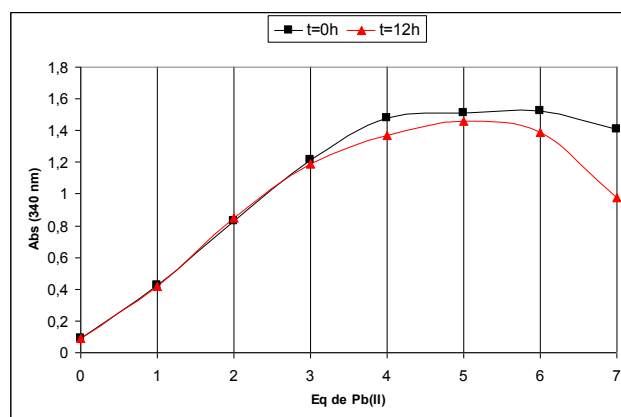


Figura 159. Gráfica de absorbancia a 340 nm vs. eq de Pb(II) de Pb-Cup1 a tiempo 0 y 12 horas de estabilidad.

Otro de los factores que se estudió es la concentración de Zn-Cup1, para así conocer el efecto que pueda tener en la interacción de los iones Pb(II) con la proteína menos concentrada. Para esto se realizaron las valoraciones con Pb(II) de Zn-Cup1, a 10 y 5 μ M, manteniendo las otras condiciones estándar (pH 4.5 y 45 °C).

En Zn-Cup1 a 10 μ M en presencia de Pb(II) (Fig. 160), se observó la aparición de absorciones en el DC y UV-vis similares a las observadas en el experimento a 20 μ M. Estas señales aumentan en intensidad desde el 1° hasta el 3° eq de Pb(II) añadido y con las siguientes adiciones de Pb(II) la proteína comienza a desestructurarse. La saturación de las señales espectroscópicas se da a partir del 3° eq de Pb(II) añadido a Zn-Cup1.

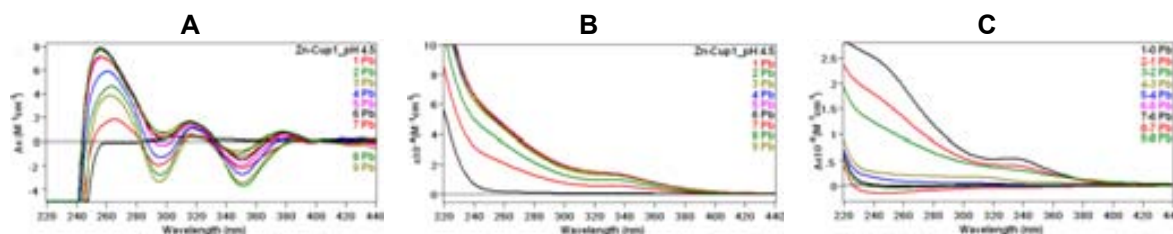


Figura 160. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de la preparación Zn-Cup1 a 10 μ M, pH 4.5 y 45 °C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

Así también, en Zn-Cup1 a 5 μ M frente a Pb(II) (Fig. 161) se observó un conjunto de espectros de DC y UV-vis análogos a los obtenidos al adicionar Pb(II) a la proteína a 10 μ M, pero estas absorciones son más intensas. A partir de la adición del 4° eq de Pb(II) la proteína llega a una saturación parcial.

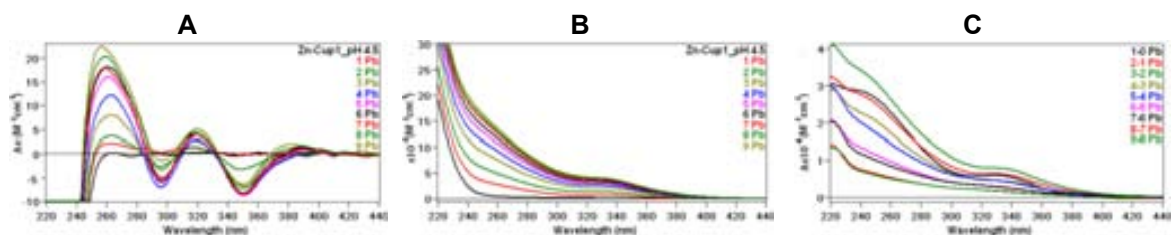


Figura 161. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de la preparación Zn-Cup1 a 5 μ M, pH 4.5 y 45 °C hasta 9 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

La Fig. 162 muestra los resultados de la valoración de Zn-Cup1 con Pb(II) a diferentes concentraciones, dejando el t_{est} necesario para cada equivalente (1 hora). En este caso, y a diferencia de lo observado en Zn₇-MT1 en presencia de Pb(II), se aprecia a simple vista que la evolución de las valoraciones depende de la concentración de proteína. La intensidad de las señales de DC de las tres valoraciones no son idénticas, pero sí del mismo orden.

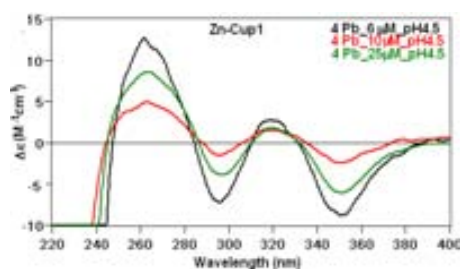


Figura 162. Comparación de los espectros de DC del 4° eq de Pb(II) de las valoraciones 5, 10 y 20 μ M de Zn₄-Cup1 a pH 4.5 y a 45 °C.

Así, se puede concluir que en general, la concentración de Zn-Cup1 afecta a como ésta coordina el Pb(II), ya que según su concentración varía la quiralidad de los complejos formados y el punto de saturación. A mayor concentración de Zn-Cup1 menor será la intensidad de las absorciones, tanto en los espectros de DC como en los de UV-vis. Respecto al punto de saturación de la proteína se puede establecer que se alcanza para el 4° eq de Pb(II) añadido a Zn-Cup1 5 μ M, entre el 3° y 4° eq de Pb(II) para soluciones 10 μ M y para el 5° eq de Pb(II) a 20 μ M.

Otro de los factores estudiados es el pH, para conocer el efecto que tiene sobre la coordinación de Pb(II) a Zn-Cup1, para esto se valoró una solución 20 μ M de Zn-Cup1 a pH 4.5 y 45 °C hasta la adición de 7 eq de Pb(II) (Fig. 163, arriba). Llegado a este punto, se aumentó el pH a 7.0, dejándolo estabilizar la preparación y se registraron los espectros. Posteriormente, se bajó el pH a 3.0 (o hasta obtener la forma apo-MT), se repitió el proceso anterior (estabilización y toma de espectros) y finalmente se volvió a subir el pH hasta 4.5 para observar si las especies formadas después del ciclo de pH recuperaban su estructura inicial.

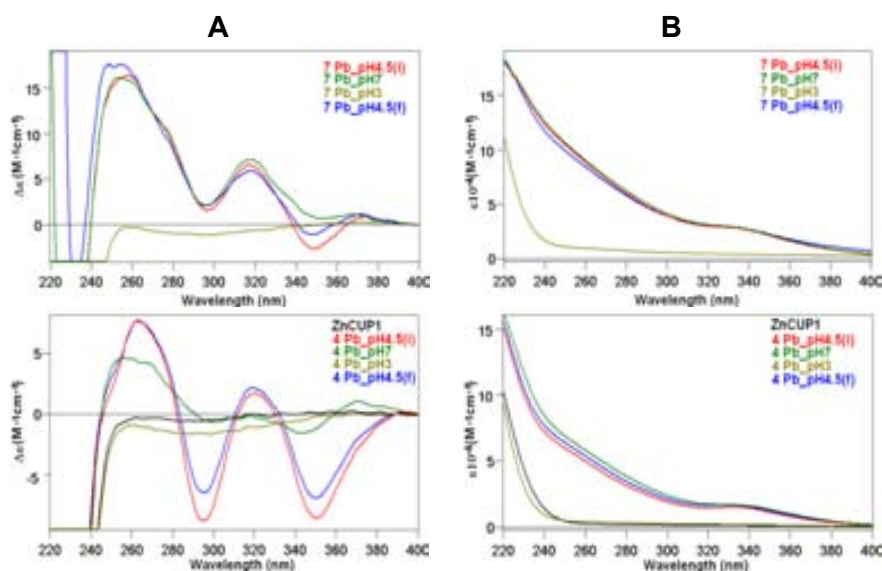


Figura 163. Variación del pH de la valoración de una solución 20 μ M de Zn-Cup1 a pH 4.5 registrada en los espectros de (A) DC y (B) UV-vis del 7° (arriba) y 4° (abajo) eq de Pb(II), a 45 y 25 °C, respectivamente.

El experimento realizado no condujo a prácticamente ningún cambio espectral ni de DC (Fig. 163A) ni de UV-vis (Fig.163B) entre pH 4.5 y pH 7.0 y se consiguió fácilmente la apo-Cup1 acidificando hasta pH 3.0, reflejando el comportamiento diferencial entre Zn-MT1 y Zn-Cup1 frente a Pb(II). En cambio, cuando se repitió el experimento a 25 °C pero después de añadir tan sólo 4 eq de Pb(II), sí que se observaron variaciones en los espectros de DC y UV-vis (Fig. 163, abajo). Curiosamente, el paso de pH 4.5 a 7.0 provoca la desestructuración de las especies Pb-Cup1 muy probablemente por la precipitación de Pb(II). A pH 3.0 se obtienen los espectros correspondientes a la apo-Cup1 y basificando hasta pH 4.5 prácticamente se recuperan los espectros iniciales.

En base a los resultados anteriores, se realizó una valoración con iguales condiciones estándar, 20 μ M y 25 °C, pero variando el pH a 7.0 (Fig. 164).

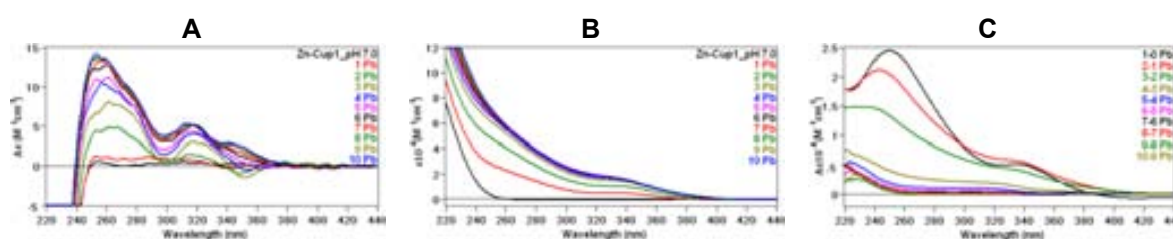


Figura 164. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de la preparación Zn-Cup1 a 20 μ M, pH 7.0 y 25 °C hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

La adición de Pb(II) a la preparación Zn-Cup1 provoca la aparición de cuatro absorciones en los espectros de DC: 260(+), 298(+), 320(+) y 350(+) nm que incrementan su intensidad de manera gradual e isodicroica hasta el 3° eq de Pb(II)

añadido (Fig. 164). Sólo la adición del 3° eq de Pb(II) muestra un máximo negativo a 350(-) nm y la incorporación del 4° eq de Pb(II) desplaza las absorciones hacia arriba revelando la desestructuración de la proteína.

Los espectros UV-vis y de dif. UV-vis (Fig. 164 B-C) muestran un incremento de la intensidad de las absorciones a 240-250 y 340 nm, de *tipo II* desde el 1° hasta el 3° eq de Pb(II) añadido. Tras la adición del 4° eq de Pb(II) las señales no varían, sugiriendo que la presencia de más iones Pb(II) no genera nuevos cromóforos.

La saturación de Zn-Cup1 en estas condiciones se da para el 3° eq de Pb(II) añadido. Por lo tanto, los datos obtenidos indican la formación de una o más especies que contengan como máximo 3 iones Pb(II) y tal vez algunos Zn(II) residuales.

Al comparar las valoraciones con Pb(II) de Zn-Cup1 a diferentes pHs, 7.0 y 4.5 (en presencia/ausencia de Zn(II)) (Fig. 165) se observan pequeñas variaciones en los espectros de DC atribuidas a la estructuración de la proteína. Sin embargo, en los espectros de UV-vis se observan absorciones análogas, de *tipo II*, que revela un mismo entorno de coordinación en ambos pHs.

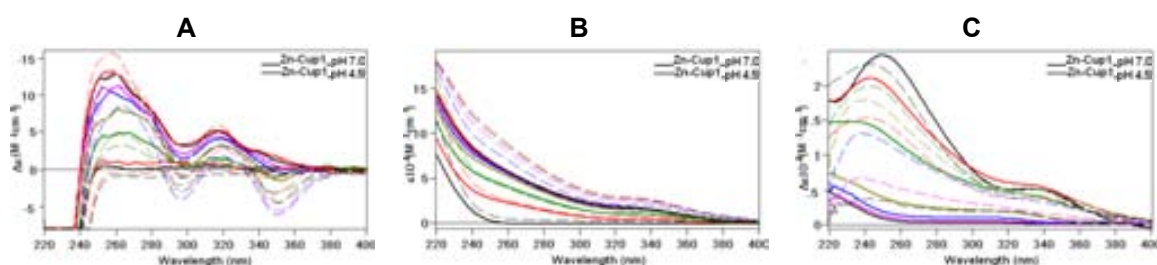


Figura 165. Comparación de los espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de una solución 20 μ M de Zn-Cup1 a pH 7.0 y 4.5, a 25 °C hasta 10 eq de Pb(II) con máx. t_{est} .

Los resultados obtenidos en estas nuevas condiciones experimentales permitieron observar que, a pH neutro la huella espectral es diferente a la observada anteriormente a pH 4.5, siendo la mayor diferencia el hecho de que las absorciones son menos intensas y no alcanzan a tener los máximos negativos. Esto indica que la proteína a pH 7.0 tiene una estructuración menos compacta frente a los iones Pb(II), y sólo a partir de la adición del 2° eq de Pb(II) aparecen las señales características del clúster Pb-Cup1, pero éstas no se muestran tan definidas como a pH ácido.

Siguiendo con el estudio del efecto de la concentración de proteína en la interacción de Pb(II) se realizaron las valoraciones con plomo(II) de Zn-Cup1 a pH 7.0 y 25 °C a las concentraciones, 10 y 5 μ M. La preparación Zn-Cup1 a 10 μ M en presencia de Pb(II) (Fig. 166) provocó la aparición de absorciones análogas a las observadas en Zn-Cup1 a

20 μM al enlazar Pb(II), pero menos intensas y definidas. La saturación de las señales espectroscópicas se da a partir del 4° eq de Pb(II) añadido, mientras que para 20 μM se dio tras la adición del 3° eq Pb(II).

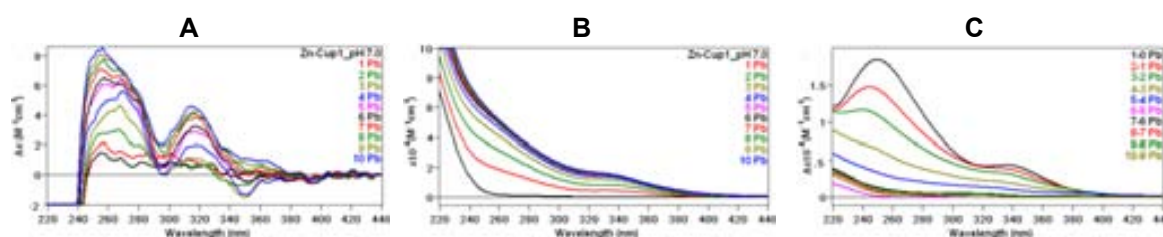


Figura 166. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de la preparación Zn-Cup1 a 10 μM , pH 7.0 y 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

En el caso de la valoración con Pb(II) de la solución 5 μM de Zn-Cup1 (a pH 7.0 y 25 $^{\circ}\text{C}$) aparecen absorciones de DC menos definidas que en los otros experimentos a mayores concentraciones. Los espectros de DC (Fig. 167A) revelan una baja estructuración de los clústeres Pb-Cup1 formados. En los espectros de UV-vis y dif. UV-vis (Fig. 167C) se observan absorciones de *tipo II*. La saturación de las señales espectroscópicas de DC y UV-vis se da para el 4° eq de Pb(II) añadido.

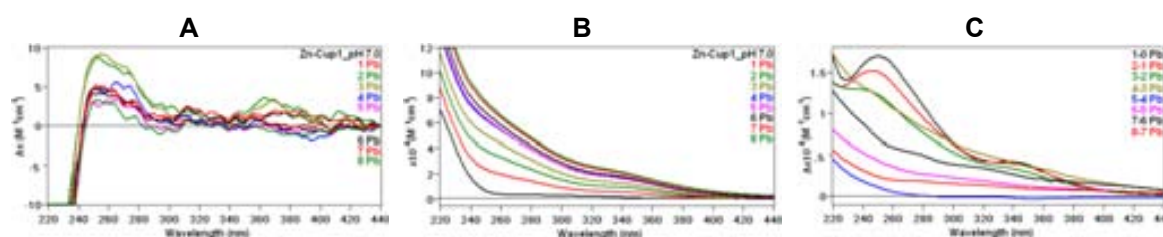


Figura 167. Espectros de (A) DC, (B) UV-vis y (C) dif. UV-vis registrados a lo largo de la valoración de la preparación Zn-Cup1 a 5 μM , pH 7.0 y 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 10 eq de Pb(II) añadidos con máx. t_{est} .

En las valoraciones con las diferentes condiciones ensayadas no se observan pérdidas de UV-vis a 240 nm, pudiendo indicar que no hay salida de los iones Zn(II) inicialmente coordinados. En cambio, sí que se puede descartar la participación del residuo de histidina en la coordinación de Pb(II), ya que los espectros de UV-vis registrados en la formación de las especies de Pb-Cup1 son análogos a los registrados para los complejos modelo Pb-dedos de Zn (Fig. 23) los cuales presentan dos bandas: una intensa a 255-260 nm ($\epsilon=16000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y otra, menos intensa, entre 300-350 nm ($\epsilon=4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) descritos por Godwin,²³³ en donde se demuestra que el Pb(II) prefiere adoptar una coordinación de piramidal trigonal a través de 3 Cys.

De acuerdo con los datos de DC y UV-vis el número de iones Pb(II) que se enlazan a Zn-Cup1 se ve afectado por dos factores: la temperatura y el pH. En cambio, las otras variables estudiadas como el tiempo de estabilización de los iones Pb(II) y la

concentración de Zn-Cup1 no muestran ningún efecto en el número de iones Pb(II) que se incorporan a la proteína, pero sí algunos en la estructuración de los complejos Pb-Cup1 formados.

2.5.2. Estudio por espectrometría de ESI-MS

En este apartado se presenta el análisis de los resultados obtenidos por espectrometría de masas (ESI-MS) de la interacción de Pb(II) con Zn-Cup1. Tal y como se describió en la parte experimental, esta técnica nos permite obtener información sobre las especies que se forman al enlazarse el ión Pb(II) a la proteína, así como la evolución y estabilidad de las especies de Pb-Cup1 respecto al tiempo.

Los experimentos realizados mediante ESI-MS se llevaron a cabo siguiendo dos metodologías: un gran exceso de plomo, 12 eq de Pb(II) a las correspondientes preparaciones 20 μ M de Zn-Cup1 a pH 7.0 a 25 °C. Y además se realizó otro experimento con 10 eq de Pb(II) a 37 °C. En todos los casos se registraron los espectros de masas durante el tiempo.

El análisis de los resultados obtenidos en estas condiciones muestra que la adición de un exceso de iones Pb(II) a la solución proteica a temperatura ambiente da lugar a la formación de especies tanto homo como heterometálicas de Pb(II), como se puede observar en la Fig. 168. Se puede apreciar que en un primer momento (10 min) tras la adición de los 12 eq de Pb(II), hay una mezcla de especies con abundancia similar: Pb_4Zn_{1-} , Pb_3Zn_{1-} , Pb_2Zn_2-Cup1 , y otros picos de menor intensidad como son Pb_{4-} , Pb_2Zn_{1-} , Pb_3Zn_2- y Pb_5-Cup1 , que se mantienen estables transcurrida 1 hora. A partir de las 2 horas las especies Pb_{4-} , Pb_{5-} , Pb_4Zn_{1-} y $Pb_3Zn_{1-}Cup1$ se mantienen durante el tiempo.

En el segundo experimento, al adicionar un exceso de 10 eq de Pb(II) a Zn-Cup1 a 37 °C, los espectros de masas registrados (Fig. 169) mostraron la formación de especies homo y heterometálicas de Pb,Zn-Cup1 análogas a las observadas en el experimento anterior (incluidos los aductos de amonio y perclorato). En un comienzo (4 min) se observó que las especies formadas con picos más intensos son: Pb_{4-} y $Pb_3Zn_{1-}Cup1$ y con menor abundancia las especies Pb_2Zn_{1-} , Pb_4Zn_{1-} , Pb_2Zn_2- y Pb_5-Cup1 . Al cabo de 1 hora varía la abundancia de estas especies siguiendo el siguiente orden: $Pb_2Zn_2- \sim Pb_3Zn_{1-}$, Pb_{4-} , Pb_2Zn_{1-} , Pb_4Zn_{1-} , Pb_1Zn_2- y Pb_5-Cup1 . A partir de las 2 horas la especie Pb_4-Cup1 se muestra como la más abundante, seguida de Pb_3Zn_{1-} y Pb_5-Cup1 . Y a las 24 horas las especies Pb_3Zn_{1-} y Pb_{4-} son las más abundantes junto a otros picos de menor intensidad Pb_2Zn_{1-} y Pb_2Zn_2-Cup1 .

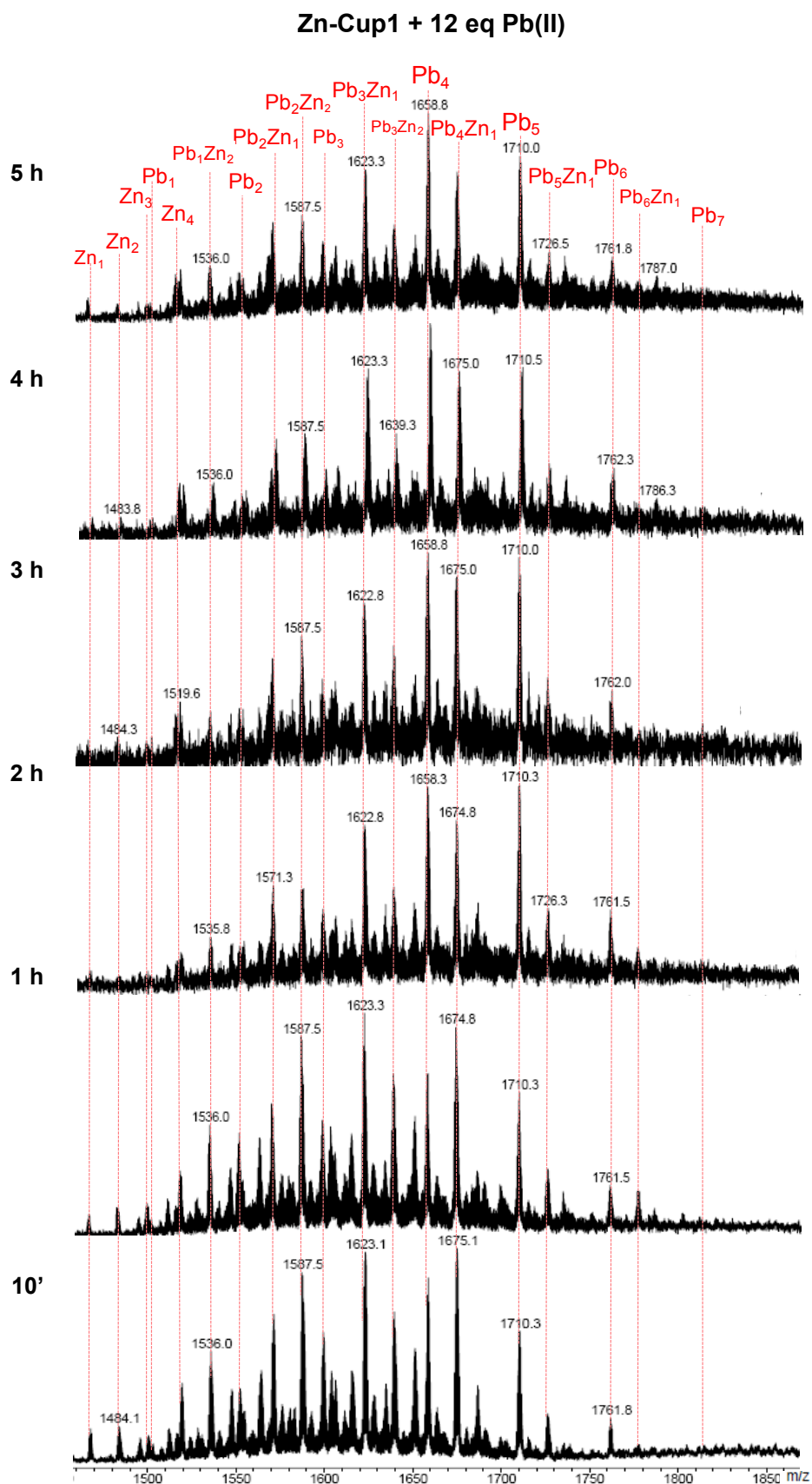


Figura 168. Espectros de ESI-MS registrados durante 5 horas que muestran la evolución de una solución 20 μM de la preparación Zn-Cup1, a pH 7.0 y 25 $^{\circ}\text{C}$, tras la adición de 12 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +4.

Zn-Cup1 + 10 eq Pb(II)

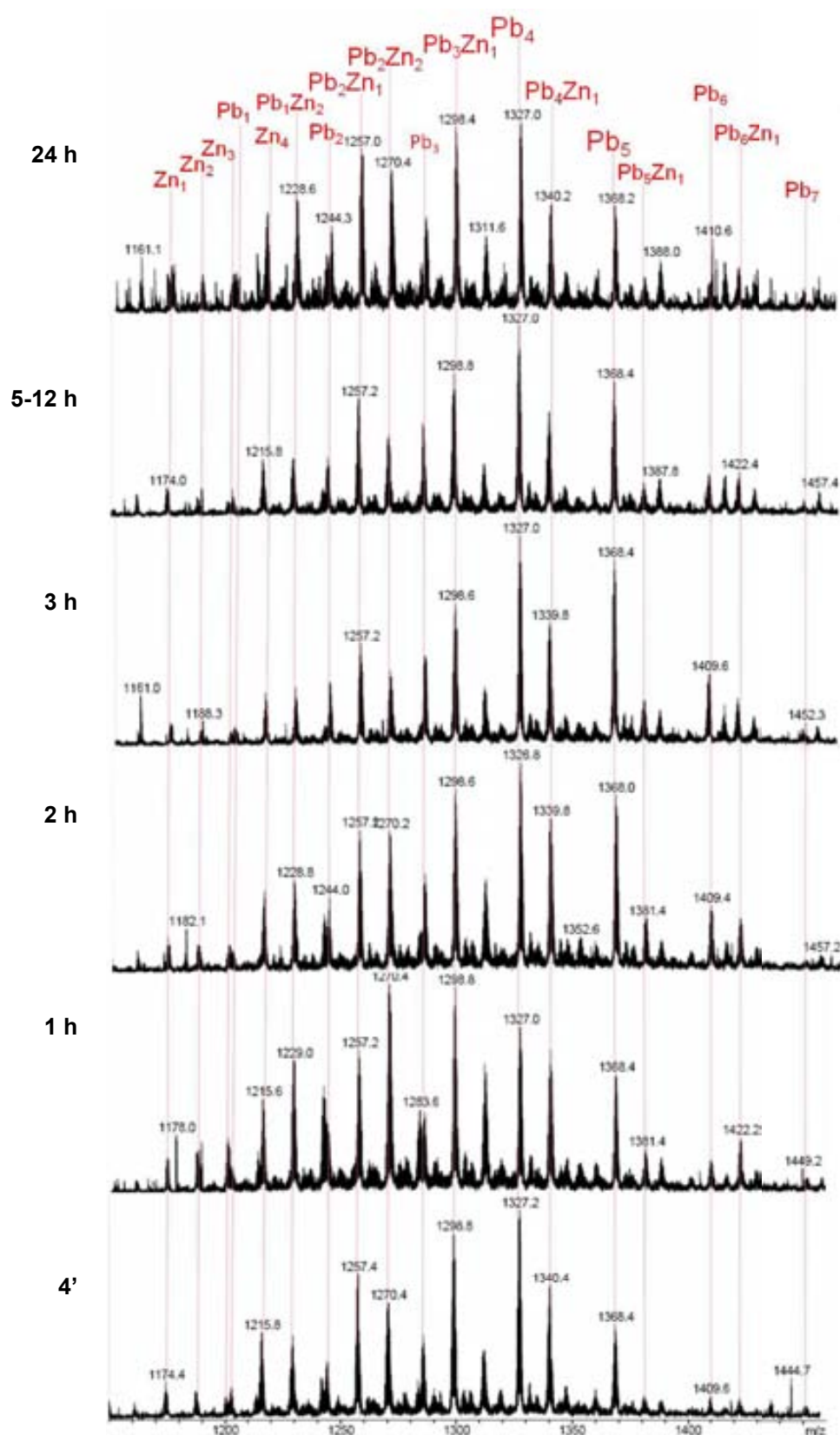


Figura 169. Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la evolución de una solución 20 μ M de la preparación Zn-Cup1, a pH 7.0 y 37 $^{\circ}$ C, tras la adición de 10 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +5.

Al comparar ambos experimentos se pudo observar que las especies más importantes tienen un contenido metálico entre 4 y 5 iones, siendo los clústeres más importantes Pb_4- y Pb_3Zn_1-Cup1 , corroborando así lo observado en las valoraciones a pH 7.0 seguidas por DC y UV-visible donde Zn-Cup1 se satura alrededor de esta cantidad de Pb(II) añadido. Así también, el número de equivalentes adicionados a la proteína y la temperatura no tiene un mayor efecto en la formación de las especies y a la estabilidad de éstas durante el tiempo.

De todas estas observaciones, se puede inferir que Zn-Cup1 a pH 7.0 en presencia de Pb(II) mantiene coordinado entre 1 o 2 iones Zn(II) y se forman las especies mixtas como Pb_xZn_y , siendo $x=5, 4, 3, 2, 1$ e $y=0, 1, 2$.

2.5.3. Estudio por microcalorimetría, ITC

Con la finalidad de obtener datos termodinámicos referentes al desplazamiento de Zn(II) por Pb(II) al valorar Zn-Cup1, se realizó un experimento mediante ITC de una solución 10 μ M de proteína, en condiciones de pH 4.5 y a una temperatura de 45 °C.

$K \times 10^{-5}$	ΔG (cal/mol)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/molK)	N (Eq de Pb(II))
3.15 ± 0.39	-7995	-7731 ± 200.5	0.855	3.96 ± 0.07

Tabla 40. Datos termodinámicos obtenidos a partir del experimento de ITC de la valoración de Zn-Cup1 a 10 μ M, a pH 4.5 y 45 °C, con Pb(II). El resultado de ΔG se ha obtenido a partir de la fórmula $\Delta G = -RT \ln K$.

Los resultados obtenidos de esta valoración por ITC (Fig. 170, Tabla 40), muestran que el desplazamiento de Zn(II) por Pb(II) se da en un proceso espontáneo con ΔG de -7995 cal/mol, así también termodinámicamente favorable, tanto entrópica como entálpicamente, tal como se puede observar en la Tabla 40, en donde la diferencia de entropía (ΔS) es de 0.855 cal/molK indica que los nuevos clústeres de Pb(II) formados presentan un mayor desorden molecular que los iniciales de Zn(II). Así también la diferencia de entalpía (ΔH) es -7731 cal/mol revela un proceso energéticamente favorable, siendo una reacción exotérmica. El número de sitios de coordinación (N) corresponden a aproximadamente 4 iones Pb(II), éste coincide con el punto de saturación observado en los experimentos espectroscópicos de DC y UV-vis en condiciones de pH 7.0. Así también, en los espectros de dif. UV-vis se observó que la adición de los cuatro primeros equivalentes de Pb(II) a Zn-Cup1 provoca la aparición de absorciones de *tipo II*, revelando un mismo entorno de coordinación. También se puede relacionar este N con la formación de la especie Pb_4-Cup1 observada por ESI-MS. La curva experimental no se ajusta en un comienzo a la curva teórica, que se puede deber

a una mayor entalpía del proceso, no como en los otros experimentos que indica sitios de coordinación diferentes en la proteína.

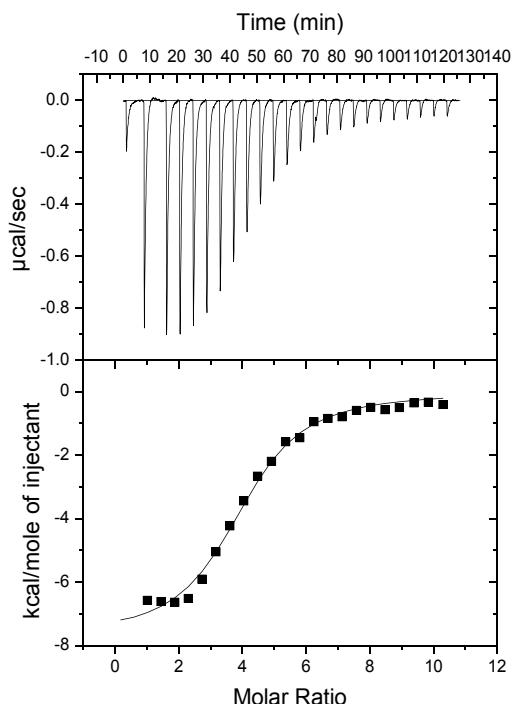


Figura 170. Termograma (arriba) y representación del calor desprendido (a bajo) frente a los equivalentes de Pb(II) añadidos a una solución 10 μ M de Zn-Cup1 a pH 4.5 y 45 °C con Pb(II), de acuerdo con la metodología de escrita en los apartados III y VI-2.

2.5.4. Análisis global del estudio de la habilidad coordinante de la isoforma Cup1 frente a Pb(II)

A partir de los resultados obtenidos en este estudio podemos señalar que, por espectroscopía de DC y UV-vis se observó que la incorporación de los iones Pb(II) provoca la aparición de absorciones características que revelan la coordinación del ión Pb(II) a Cup1. La formación de las especies Pb_4Zn_x -Cup1, no requiere de mayores tiempos de estabilización, siendo estos cortos e iguales entre los eq de Pb(II) añadidos, entre 20' y 1 h. Así también, se demostró que la temperatura no afecta los t_{est} , pero en algunos casos sí afecta a la evolución de la muestra.

La estructura de Pb_4Zn_x -Cup1 se ve drásticamente afectada por el pH, siendo 4.5 el pH óptimo. A pH 3.0 se obtiene la apo-Cup1. En el rango $4.5 \leq pH \leq 7.0$ el clúster Pb_4Zn_x -Cup1 pierde en grado de estructuración.

La concentración de Zn-Cup1 sólo afecta al punto de saturación de la proteína y de manera leve las intensidades de las absorciones de DC y UV-vis de las especies Pb-Cup1 formadas.

Por ESI-MS se pudo observar la formación de especies homo y heterometálicas de Pb(II) que varían con el tiempo, y tanto al añadir 4 eq de Pb(II) como un exceso de iones Pb(II) a pH 7.0, se forman las mismas especies: $Pb_6 \sim Pb_5 > Pb_4$.

Así también por ITC se pudo observar que el número de equivalentes coordinados a Zn-Cup1 es aproximadamente 4 iones Pb(II) ($3,96 \pm 0,07$).

En general, se observa un punto de equivalencia para 4 iones Pb(II) y Zn-Cup1 se satura aproximadamente a partir de 7 y 8 equivalentes de Pb(II), corroborando así que teóricamente Cup1 podría coordinar hasta 8 eq de Pb(II). De acuerdo a los datos presentados en la introducción, las absorciones de *tipo II* observadas en los espectros de dif. UV-vis reveló que el Pb(II) podría estar coordinado a la proteína por medio de tres Cys con una geometría piramidal trigonal y por tanto, se descarta la participación de la histidina.

3. Análisis de los factores experimentales que afectan la capacidad coordinante de las MTs de mamífero frente a Pb(II)

El conjunto de resultados presentados en el apartado anterior “**Estudio de la habilidad coordinante de las diferentes isoformas de MT de mamífero, sus dominios α y β y la isoforma Cup1 de levadura frente a Pb(II)**” nos permite realizar un análisis de los factores experimentales que pueden afectar a la coordinación del ión Pb(II) al enlazarse a cada una de las metalotioneínas de mamífero estudiadas, MT1, MT2, MT3 y MT4, principalmente a través de los estudios espectroscópicos de DC y UV-vis.

Como se detalló anteriormente en la metodología, y en vista de los datos obtenidos, los factores estudiados son: el pH de la solución, la concentración de la proteína, la temperatura a la que se realiza el experimento, y el tiempo de estabilización por equivalente de Pb(II) añadido. Así, también se ha observado el efecto del exceso de iones Pb(II) en las MTs estudiadas.

3.1. Efecto del pH

Este factor es relevante ya que, como se comentó en la introducción y metodología, el pH afecta a las MTs que se evidencia en que su estructura metalada (pH neutro) y en la forma apo (pH ácido) son diferentes. Por otro lado, para trabajar con plomo(II) se requiere un pH ligeramente ácido para evitar su hidrólisis, por lo que a priori se trabajó a pH 4.5, pero más tarde se vió que en algunas ocasiones, los resultados a pH 4.5 y 7.0 no son equivalentes, y por tanto, se determinó a que pH es conveniente trabajar en cada una de las MTs.

3.1.1. Isoforma MT1

La primera evidencia del efecto del pH en la estructuración de las especies Pb-MT se pudo observar en un experimento con Zn₇-MT1, descrito anteriormente, donde una vez añadidos 5 iones plomo(II) a una solución de Zn₇-MT1 a 55 °C y pH 4.5, se varió el pH de la solución, observándose diferencias en los espectros de DC registrados en los diferentes valores de pH (por orden 4.5, 7.0, 3.0, 1.5 y finalmente 4.5) (Fig. 41), revelando así que el pH de la solución afecta a la proteína cuando está coordinada con Pb(II).

El efecto del pH también se pudo observar al comparar dos valoraciones de Zn₇-MT1 con Pb(II) en idénticas condiciones de temperatura (55 °C) y concentración de proteína (5, 10 ó 20 μ M), pero estando tamponadas una a pH 4.5 y la otra a pH 7.0 (ver Tabla 2).

Cuando se comparan los resultados obtenidos en las condiciones estándar, 10 μM y 55 $^{\circ}\text{C}$, las diferencias más importantes entre los espectros registrados a ambos valores de pH fueron que: a pH 4.5 (Fig. 38) éstos son más intensos que a pH neutro (Fig. 42). Además los máximos de absorción de DC no son exactamente los mismos, observándose que la evolución de las señales es diferente para los dos pHs. La saturación varía con el pH, a 4.5 se da a partir del 5° eq Pb(II) (Fig. 171A), mientras que a pH 7.0 se satura tras el 9° eq de Pb(II) añadido (Fig. 171B). Los mismos efectos del pH se han podido observar al comparar las valoraciones realizadas a otras concentraciones de proteína (5 y 20 μM).

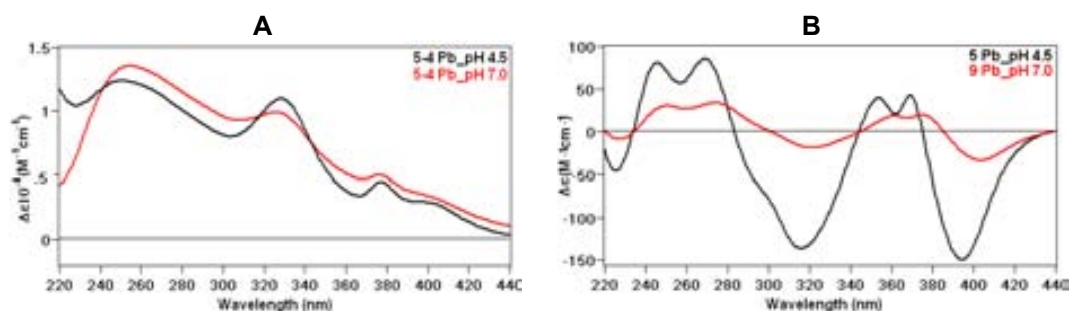


Figura 171. Espectros de dif. UV-vis (A) del 5° eq de Pb(II) añadido a Zn₇-MT1 a pH 4.5 (línea negra y pH 7.0 (línea roja), (B) espectros de DC del 5° y 9° eq de Pb(II) a pH 4.5 y 7.0, respectivamente.

Así, el pH provoca un efecto interesante en la evolución de los espectros de DC al adicionar plomo(II) a la proteína. En el caso de las valoraciones de Zn₇-MT1 a pH 4.5 se observó un incremento gradual de las absorciones a partir del 1° eq Pb(II) añadido, observándose exactamente los mismos máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda a lo largo de toda la valoración mediante un proceso completamente isodicroico (Fig. 172A). En cambio, en las valoraciones a pH 7.0 (Fig. 172B) se necesita hasta 3 iones Pb(II) para llegar a obtener una huella espectral análoga a la observada a pH ácido, si bien con una intensidad muy inferior.

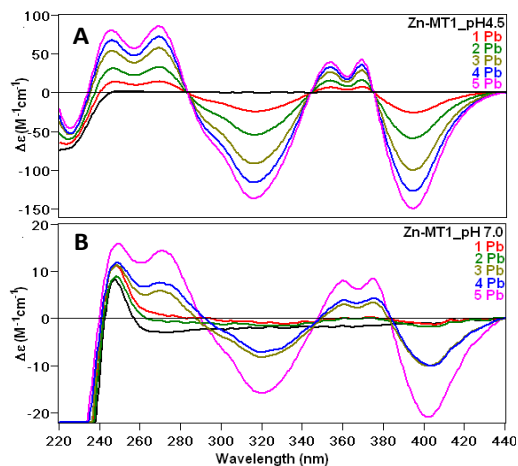


Figura 172. Espectros de DC de la valoración de una solución 10 μM de Zn₇-MT1 a (A) pH 4.5 y (B) pH 7.0 a 55 $^{\circ}\text{C}$ con 5 eq de Pb(II) con máx t_{est} .

El mismo efecto se puede ver reflejado en los espectros de dif. UV-vis, a pH 4.5 se pueden apreciar claramente las diferentes absorciones desde el 1° eq de Pb(II) añadido, apreciándose las denominadas bandas de “tipo I” (Fig. 173A). En cambio, a pH 7.0 los

incrementos de intensidad son inferiores, por lo que las señales apenas se pueden apreciar, además de observarse varios tipos de absorciones en los primeros iones Pb(II) añadidos, principalmente de “*tipo II*” (Fig. 173B), indicando probablemente diferentes tipos de coordinación del catión Pb(II).

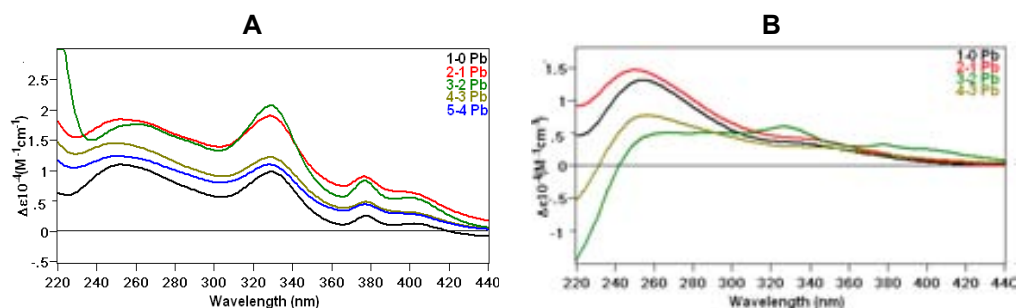


Figura 173. Espectros de dif. UV-vis correspondientes al efecto de los primeros 5 eq Pb(II) añadidos en la valoración de una solución 10 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ a 55 $^\circ\text{C}$, pH (A) 4.5 y (B) 7.0.

Se debe tener en cuenta que la diferencia más significativa entre las valoraciones a pH neutro y pH ácido es la fuerza del enlace Zn-SCys en la especie inicial $\text{Zn}_7\text{-MT1}$. A pH 4.5 se puede observar en los espectros de DC (Fig. 174) la disminución de la señal a 240 nm del cromóforo Zn-SCys, y por ESI-MS la formación de especies con menor contenido metálico en Zn(II), siendo $\text{Zn}_4\text{-MT1}$ la más abundante y le siguen en orden; la apo-MT1 > $\text{Zn}_3^- \sim \text{Zn}_5^- > \text{Zn}_1^- > \text{Zn}_2^- \sim \text{Zn}_6^- > \text{Zn}_7\text{-MT1}$ (Fig. 37). Es por esto que las diferencias observadas en las valoraciones a ambos valores de pH parecen indicar que la presencia de Zn(II) fuertemente enlazado dificulta en cierta medida la coordinación del ión Pb(II) a MT1. Así a pH ligeramente ácido, donde los iones Zn(II) son fácilmente desplazados por Pb(II), se obtienen especies Pb-MT1 bien estructuradas desde la primera adición, mientras que a pH neutro, los iones Zn(II) están fuertemente enlazados, por lo que hace falta añadir una cierta cantidad de Pb(II) para poder apreciar las señales típicas de la coordinación de Pb(II) a las MTs, si bien con una intensidad muy inferior a la registrada a pH 4.5, indicativo de un estructuración muy pobre.

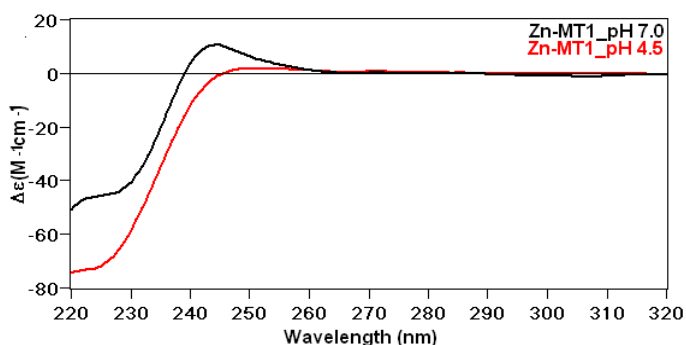


Figura 174. Espectros de DC correspondientes al efecto de la variación de pH de 7.0 a 4.5 de una solución 10 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ a 55 $^\circ\text{C}$.

3.1.2. Isoforma MT2

En la isoforma MT2, se observó que el pH influye en la estructuración de los agregados Pb-MT2 (Fig. 175), por un lado a pH 4.5 las absorciones aparecen desde la adición del 1° eq de Pb(II) y éstas son definidas alcanzando todos los máximos, en cambio a pH 7.0 éstas no aparecen al comienzo de la valoración, sino a partir del 3° eq de Pb(II) revelando una menor estructuración de las especies formadas.

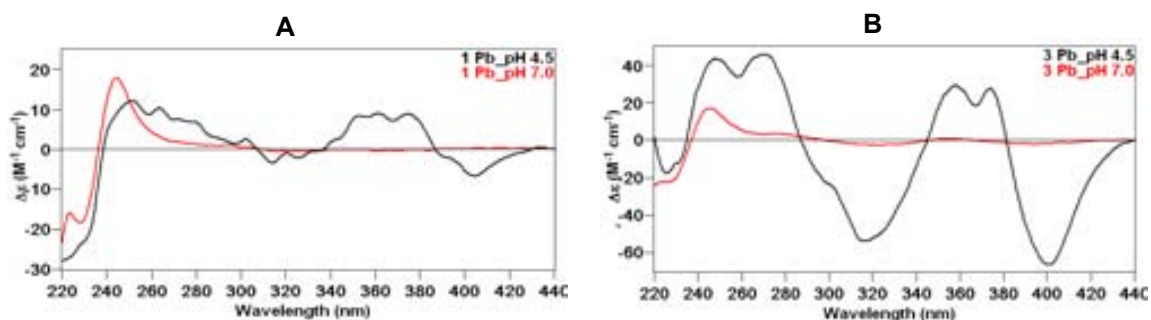


Figura 175. Espectros de DC del (A) 1° y (B) 3° eq de Pb(II) añadido a Zn₇-MT2 a 37 °C a pH 4.5 y 7.0.

Así también el pH afecta a la evolución espectral por equivalente de Pb(II) añadido, por lo que la saturación de Zn₇-MT2 es diferente; a pH 4.5 se da para 6 iones Pb(II) y a pH 7.0 a partir del 10° eq de Pb(II) añadido. En la Fig. 176, se puede observar que a pH 7.0 las absorciones de DC no alcanzan la intensidad de las señales a pH 4.5, y los máximos son menos definidos.

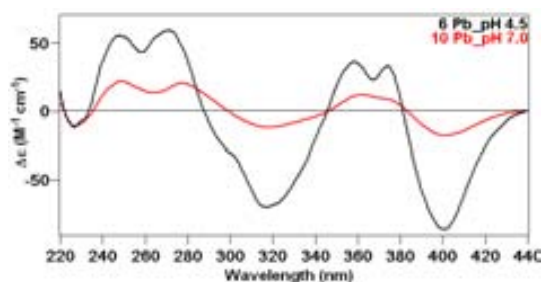


Figura 176. Espectros de DC del 6° y 10° eq de Pb(II) añadido a Zn₇-MT2 a 37 °C a pH 4.5 y 7.0, respectivamente.

Además, en los espectros de dif. UV-vis (Fig. 177) se puede observar que a pH 4.5 las absorciones son de *tipo II*, en cambio a pH 7.0 aparecen las cuatro bandas de *tipo I*, que revela que los clústeres Pb-MT2 formados a ambos pHs no son idénticos, probablemente dando lugar a entornos de coordinación diferentes.

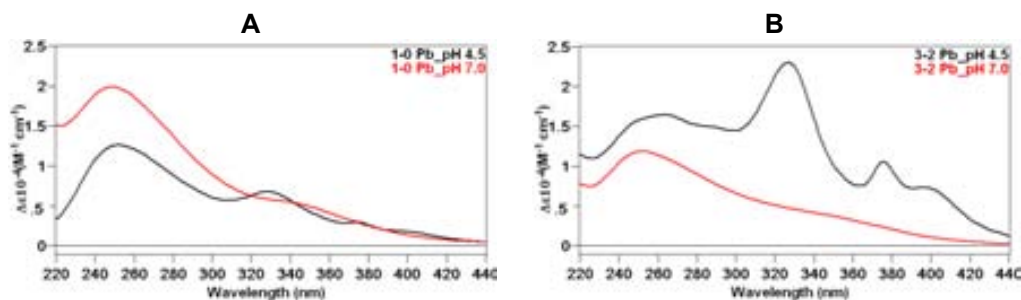


Figura 177. Comparación de espectros de dif. UV-vis del (A) 1° y (B) 3° eq de Pb(II) añadido en las valoraciones 10 μM de Zn₇-MT2, a pH 4.5 y 7.0 a 37 °C.

3.1.3. Isoforma MT3

En esta proteína al adicionar los iones Pb(II) el pH no muestra ningún efecto en la estructuración final de las especies Pb-MT3 formadas, tal y como se puede observar en los espectros de DC (Fig. 178A). Sin embargo, sí influye en la evolución de las señales de DC para cada equivalente de Pb(II) incorporado a Zn-MT3 (Fig. 178B), que podría indicar un efecto en la quiralidad de los clústeres Pb-MT3 y cómo evolucionan las especies intermedias.

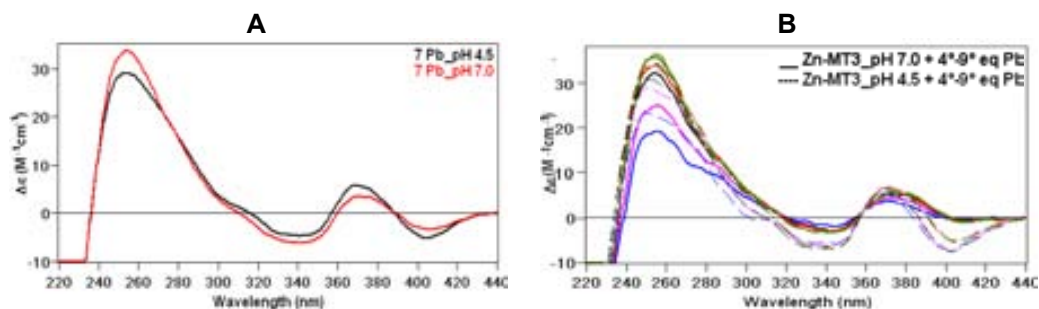


Figura 178. Comparación de los espectros de DC (A) del 7° eq de Pb(II) añadido y (B) la evolución espectral del 4° al 9° eq de Pb(II) añadido en las valoraciones de Zn-MT3 a 55 °C, pH 4.5 y 7.0.

3.1.4. Isoforma MT4

El pH tiene un efecto determinante en la coordinación de Pb(II) a Zn₇-MT4, ya que esta interacción sólo es posible a pH 4.5 provocando la aparición de las absorciones características de la formación de las especies Pb-MT1, tal y como se pudo observar anteriormente en la Fig. 147 del apartado 2.4. En cambio, a pH 7.0 los 7 iones Zn(II) iniciales se mantienen coordinados a MT4 impidiendo la formación de los clústeres Pb-MT4. A continuación en la Fig. 179 se muestran los espectros de DC y UV-vis del 7° eq de Pb(II) añadido a Zn₇-MT4.

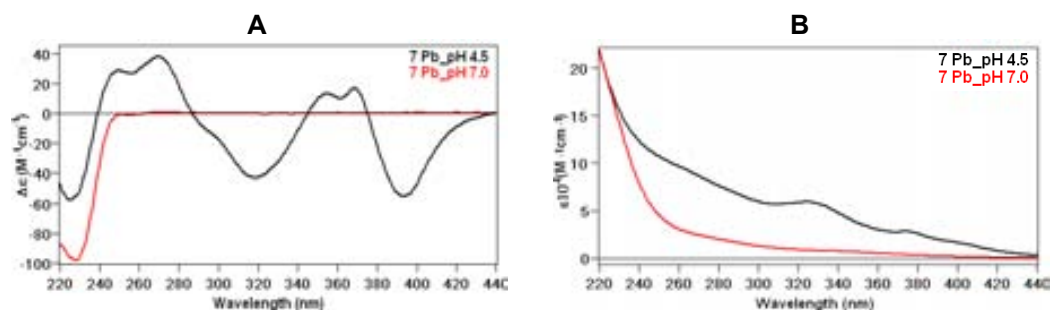


Figura 179. Comparación de los espectros de (A) DC y (B) UV-vis del 7° eq de Pb(II) añadido en la valoración de una solución 20 μM de Zn₇-MT4 a 55 °C a pH 4.5 y 7.0.

3.2. Efecto de la concentración de la proteína

Otro de los factores que se ha investigado es la influencia de la concentración de la proteína en la coordinación de Pb(II).

3.2.1. Isoforma MT1

En el caso de MT1, se realizaron valoraciones con Pb(II) a diferentes concentraciones de proteína, 5, 10 y 20 μM , manteniendo las otras condiciones consideradas estándar para este estudio (pH 4.5 y 55 $^{\circ}\text{C}$). Los espectros de DC y UV-vis registrados para las tres valoraciones (Tabla 42) muestran una evolución de los espectros muy similar entre sí, si bien la intensidad de los espectros no es la misma, variando de forma directamente proporcional a la concentración (a mayor concentración mayor es la intensidad de las señales) (Tabla 41).

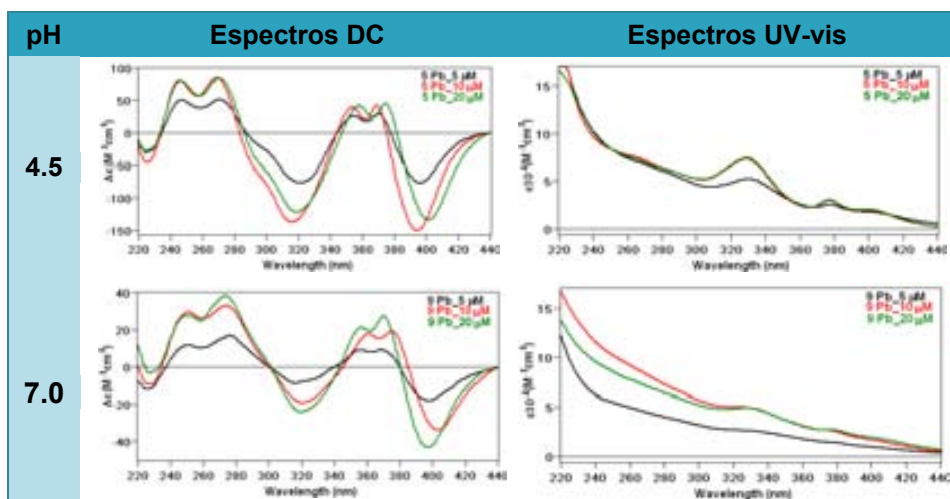


Tabla 41. Comparación de los espectros de DC y dif. UV-vis registrados a 55 $^{\circ}\text{C}$, al adicionar: el 5 $^{\circ}$ eq de Pb(II) a pH 4.5; y el 9 $^{\circ}$ eq de Pb(II) a pH 7.0, variando la concentración de proteína (5, 10 y 20 μM).

Así mismo, cuando se valora esta proteína con Pb(II) a pH 7.0, 55 $^{\circ}\text{C}$ y variando la concentración (5, 10 y 20 μM), los espectros de DC y UV-vis (Tabla 42) muestran absorciones semejantes en todas ellas, y sucede que a mayor concentración las señales son más intensas, al igual que en condiciones de pH 4.5.

En los espectros de DC y UV-vis se puede observar una relación directa entre la intensidad de las señales espectroscópicas y la concentración de proteína, a medida que aumenta la concentración de Zn₇-MT1 las absorciones se hacen más intensas. Esto es relevante ya que se está representando una magnitud de la diferencia de coeficientes molares ($\Delta\epsilon$) que no depende de la concentración, por lo que esta variación de intensidad resulta significativa que estaría directamente relacionado con un efecto de la concentración de proteína. Este efecto no se había observado anteriormente en las

MTs estudiadas en nuestro grupo y no se ha encontrado literatura que hable de este efecto.

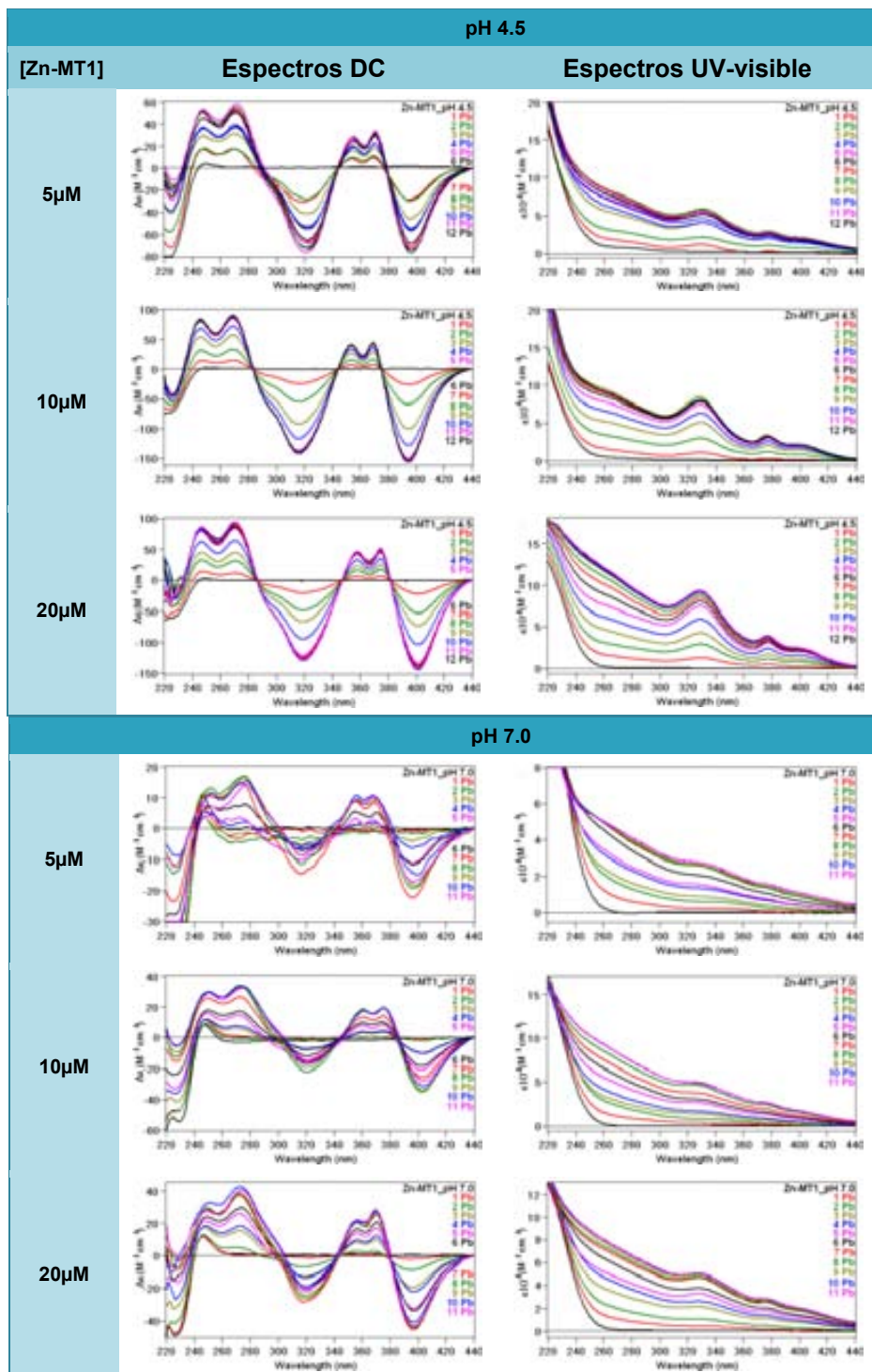


Tabla 42. Comparación de los espectros de DC y UV-vis registrados al adicionar 12 eq de Pb(II) a 55 °C, a pH 4.5 y 11 eq de Pb(II) a pH 7.0, variando la concentración de Zn₇-MT1 (5, 10 y 20 μM).

3.2.2. Isoforma MT2

Los resultados obtenidos en las valoraciones a diferentes concentraciones muestran que la concentración influye en la coordinación de Pb(II) a Zn₇-MT2, causando un efecto en la evolución de los espectros de cada adición de Pb(II) y en la estructuración de las especies Pb-MT2 formadas. Pero en cambio la saturación de las señales espectroscópicas no se ve afectada, saturándose la proteína alrededor de los 11 iones Pb(II) añadidos para las tres concentraciones (5, 10 y 20 μM) estudiadas (Tabla 43), por lo que no influye en la cantidad de iones Pb(II) que pueda coordinar MT2, sino en el proceso de entrada de este metal.

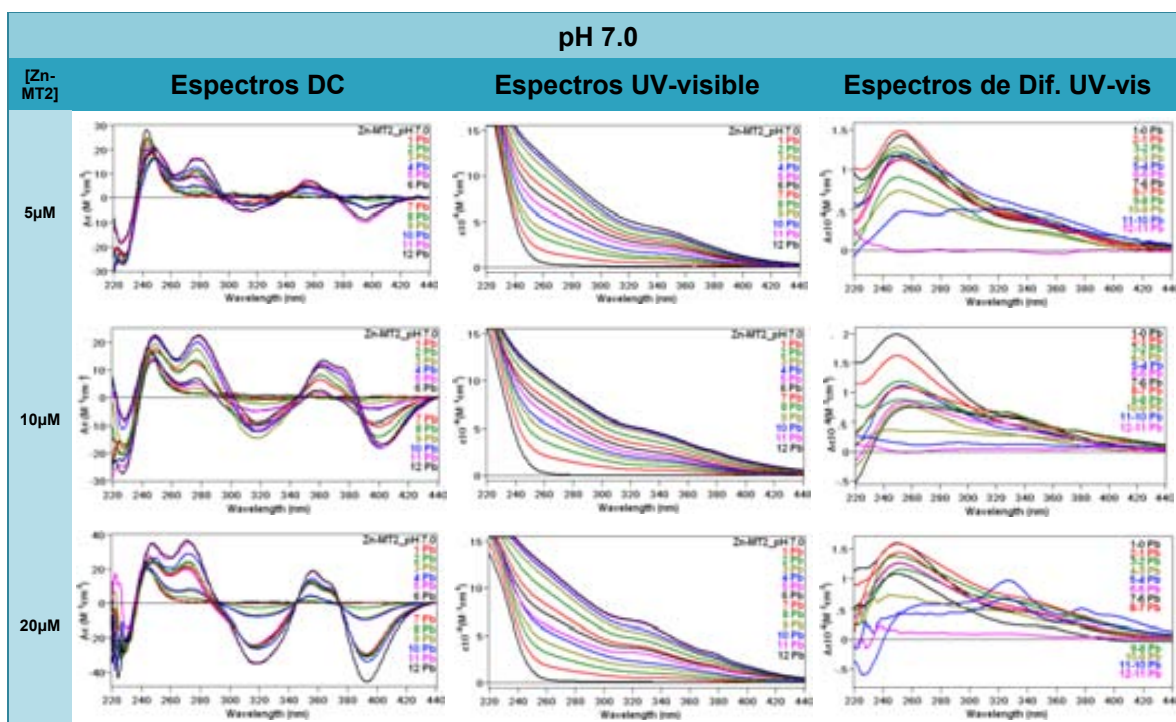


Tabla 43. Comparación de los espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis registrados al adicionar 12 eq de Pb(II) a 37 °C a pH 7.0, variando la concentración de Zn₇-MT2 (5, 10 y 20 μM).

En los espectros de DC (Fig. 180) se pudo observar una de las diferencias más visibles entre las concentraciones, en donde a menor concentración de proteína las absorciones entre 330 y 380 nm (de la segunda M) no alcanzan los máximos y mínimos observados a 20 μM, principalmente la absorción a 375 nm.

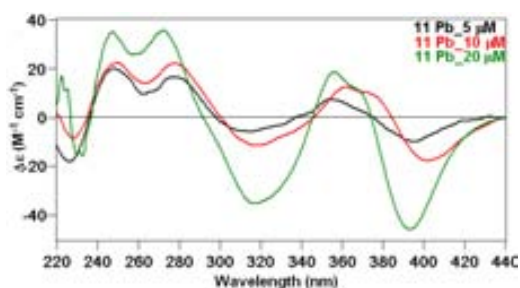


Figura 180. Espectros de DC del 11° eq de Pb(II) añadido de la valoración de una solución 10 μM de Zn₇-MT2 a pH 7.0 y 37 °C.

3.2.3. Isoforma MT3

En el estudio de Zn-MT3 la incorporación de los iones Pb(II) es levemente afectada por la variación de la concentración. Al comparar los espectros de DC y UV-vis (Tabla 44) se ha observado que a medida que aumenta la concentración de Zn-MT3, la saturación de las señales espectroscópicas indica una mayor capacidad de la proteína para coordinar iones Pb(II); a 5 μM se satura a partir del 5° eq de Pb(II) añadido; a 10 μM tras la adición del 6° eq de Pb(II) y a 20 μM de Zn-MT3 para el 8° eq de Pb(II).

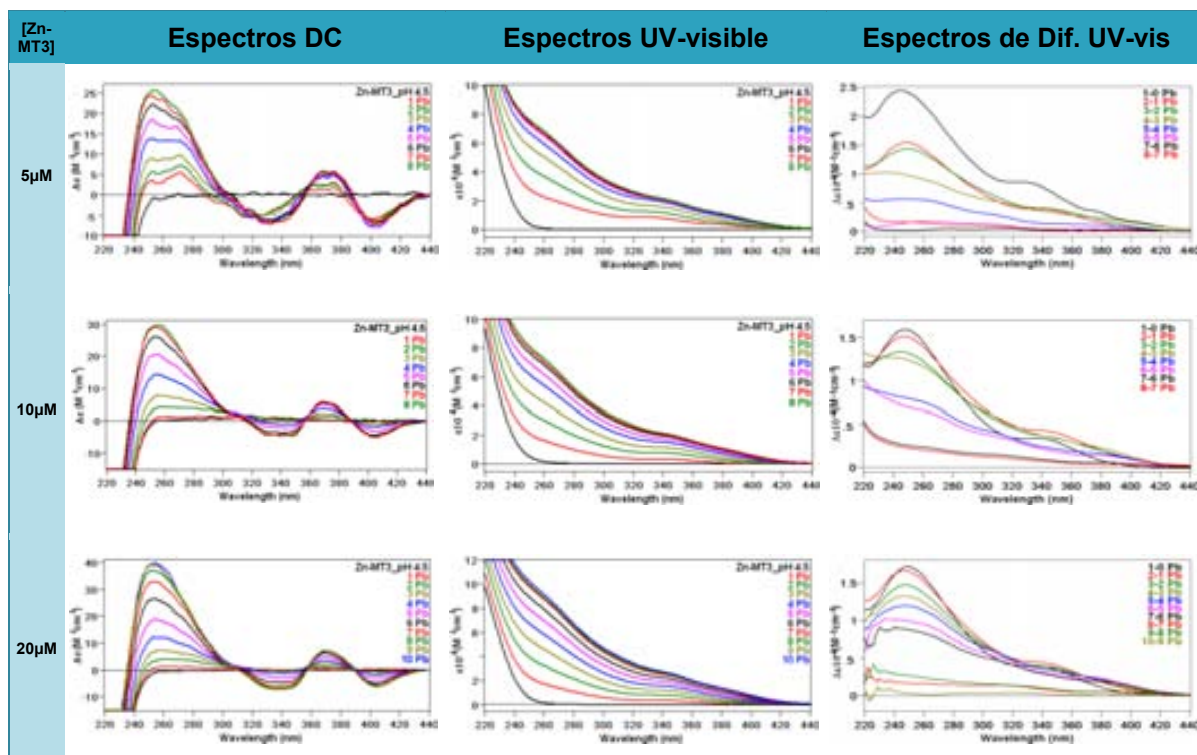


Tabla 44. Comparación de espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis de las valoraciones 5,10 y 20 μM de la preparación Zn-MT3 a pH 4.5 y a 55 °C.

En los espectros de DC se observan absorciones similares independientes de la concentración, pero mientras más concentrada es la preparación Zn-MT3 las señales son más intensas y definidas, que podrían indicar una mayor estructuración de los clústeres Pb-MT3. Así también se observa un proceso más isodicroico a mayor concentración.

En la Fig. 181 se muestran las señales de DC del 4° y 7° eq de Pb(II) añadidos a Zn-MT3 en las diferentes concentraciones, donde se puede observar que hay pequeñas variaciones antes de la saturación de Zn-MT3 (como para el 4° eq de Pb(II)). En cambio, una vez saturada la proteína (para el 7° eq de Pb(II)) la huella espectral es análoga para las diferentes concentraciones y sólo se observa que la absorción 260(+) nm es más intensa mientras más concentrada sea la proteína.

3. Análisis de los factores experimentales que afectan la capacidad coordinante de las MT de mamífero frente a Pb(II)

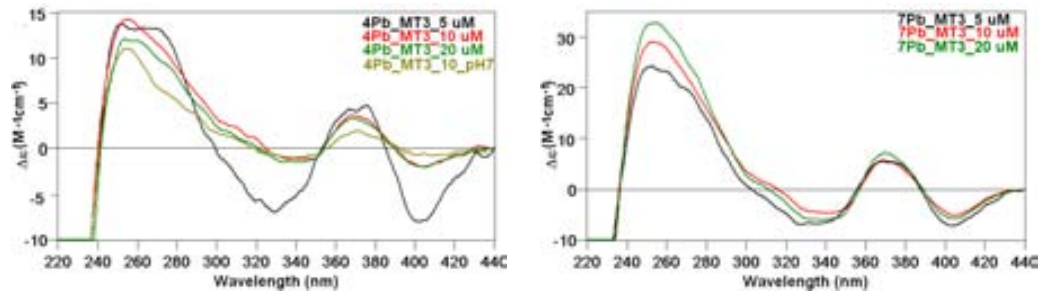


Figura 181. Comparaciones entre las concentraciones del 4° y 7° eq de Pb(II) añadido a Zn-MT3 a pH 4.5.

En los espectros de UV-vis se muestran absorciones semejantes y no se da una relación de intensidad de las señales respecto a la concentración. Pero sí se diferencian en las bandas que aparecen por cada aporte de equivalentes de Pb(II) añadidos, tal como se observó en los espectros de dif. UV-vis. En éstos, la contribución del 1° eq de Pb(II) a 5 μM muestra tres absorciones similares a las de *tipo I*, en cambio a 10 y 20 μM se observan las bandas de *tipo II*.

En relación al efecto de la concentración en la coordinación de Pb(II) a Zn-MT3 a pH 7.0, si esta aumenta o disminuye, se puede observar que las absorciones son similares y la saturación de las señales espectroscópicas no se ve afectada. Pero sí se observa un efecto en la intensidad de las señales de los espectros de DC y UV-vis, a mayor concentración éstas son más intensas. También hay un efecto en la evolución de los espectros de cada adición de Pb(II), como se puede ver en la Tabla 45.

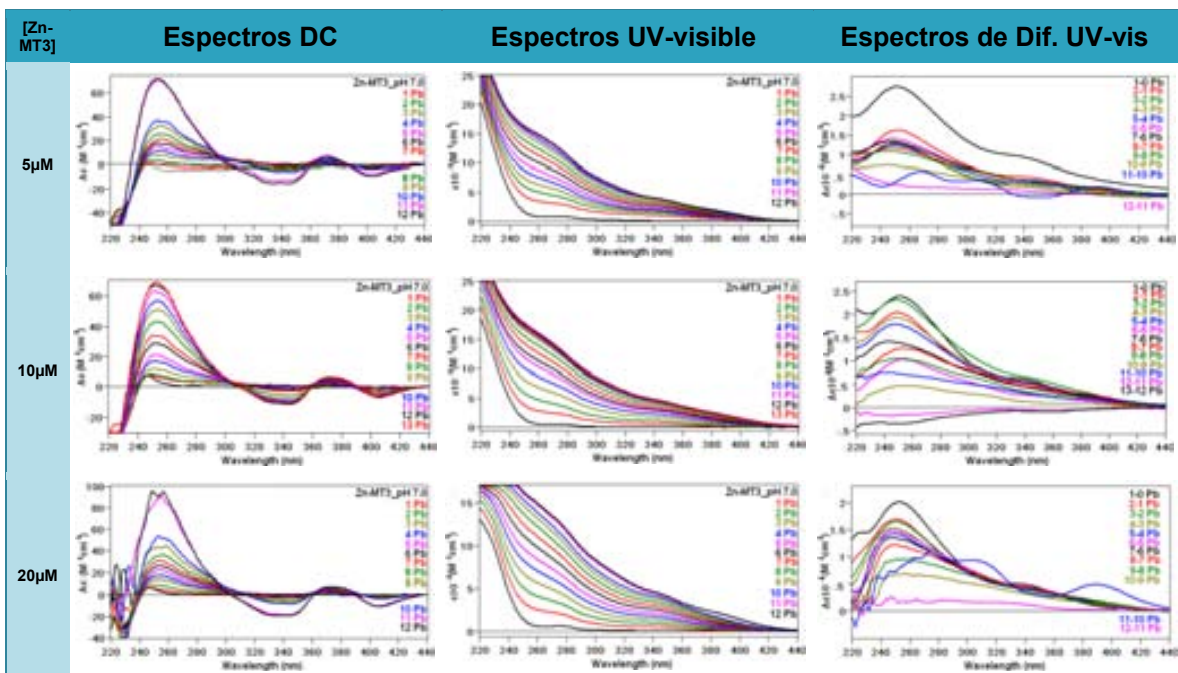


Tabla 45. Comparación de espectros de DC, UV-vis y dif. UV-vis de las valoraciones 5, 10 y 20 μM de la preparación Zn-MT3 a pH 7.0 y a 37 °C.

3.2.4. Isoforma MT4

En el estudio de MT4 con Pb(II), los resultados obtenidos han mostrado que esta proteína no coordina Pb(II) a pH 7.0, pH fisiológico. Si bien sí que se observó coordinación a pH ácido (4.5), pero como el objetivo de esta Tesis es estudiar el posible papel de las MTs de mamífero como agentes detoxificadores de Pb(II) por su importancia en los seres vivos, se estimó que no tenía sentido examinar el efecto de la concentración a un pH difícilmente alcanzable en condiciones fisiológicas.

3.3. Efecto de la temperatura

Es bien sabido que la temperatura puede provocar variaciones en la estructura terciaria de la gran mayoría de proteínas existentes, afectando así su funcionalidad. En el caso de las MTs este efecto no es tan importante, ya que son proteínas muy termoestables, soportando temperaturas hasta 80 °C sin desnaturalizarse. Este hecho es debido particularmente a que su estructura tridimensional viene determinada por la coordinación metálica. Por lo tanto, a priori, la temperatura no debería afectar de manera significativa a la coordinación metálica de las MTs. También es ampliamente conocido que los parámetros termodinámicos asociados a cualquier reacción química dependen directamente de la temperatura.

En el caso de la interacción de las MTs con Pb(II), en trabajos anteriores³³⁵ se pudo apreciar que la variación de los espectros de DC cuando se adiciona Pb(II) a una solución de Zn₇-MT1 puede tener lugar a lo largo de más de 24 horas si se realiza a 25 °C, en cambio, cuando se aumenta la temperatura considerablemente, ésta tiene lugar en cuestión de 1 ó 2 horas.

En este apartado se compararán los resultados obtenidos en las valoraciones de las proteínas estudiadas al adicionar Pb(II) a diferentes temperaturas, con el fin de observar si la temperatura de reacción tiene otros efectos en la coordinación de Pb(II) a las MTs, además de disminuir el tiempo de estabilización de las especies Pb-MT formadas.

3.3.1. Isoforma MT1

Con el fin de observar detalladamente los efectos debidos a la temperatura asociados al enlace de Pb(II) a la isoforma MT1 de mamífero, se realizó un experimento muy peculiar: se valoró con Pb(II) una solución 20 μM de Zn₇-MT1 en condiciones estándar (pH 4.5 y 55 °C) añadiéndose hasta 6 eq de Pb(II), de 1 en 1; en este punto, y una vez el espectro de DC se mostró invariante, se disminuyó la temperatura hasta

25 °C y se registraron sus espectros de DC y de UV-vis; y posteriormente, se aumentó la temperatura a 45 °C, y se volvieron a registrar los espectros (Fig. 182).

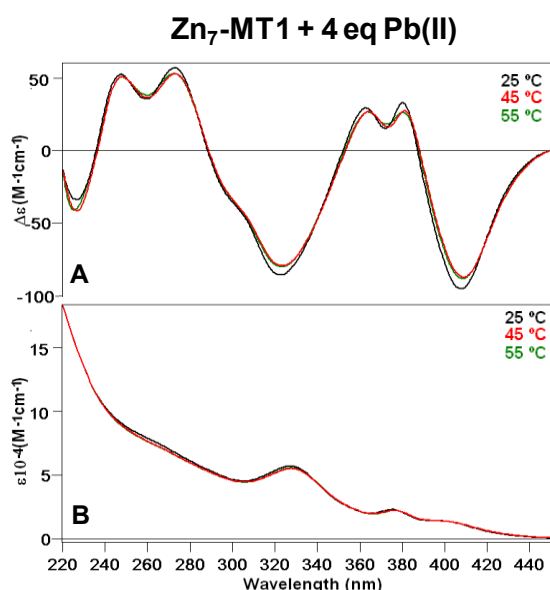


Figura 182. Espectros de (A) DC y (B) UV-vis registrados tras la adición del 5° eq de Pb(II) a una solución de Zn₇-MT1 20 μM, a pH 4.5 y donde se varió la temperatura a 25 (negro) ,45 (rojo) y 55 °C (verde) en la misma valoración.

Los espectros registrados (tanto de DC como de UV-vis) a diferentes temperaturas (25, 45 y 55 °C) son prácticamente idénticos, demostrando que la variación de la temperatura, una vez se han formado las especies Pb-MT1 correspondientes, no afecta ni a la estructuración de dichas especies ni a las absorciones asociadas a ellas, indicando así que no se produce ninguna variación del entorno coordinante alrededor del centro metálico, por lo que se corrobora la estabilidad térmica de los clústeres metal-MT formados. Analizando los espectros registrados con mayor detenimiento se puede apreciar una ligera disminución en la intensidad de los espectros de DC al aumentar la temperatura (Fig. 182A), que se atribuye a la mayor movilidad de la cadena polipeptídica a temperatura elevada, lo cual afecta levemente la estructuración de la proteína alrededor del ión Pb(II).

En otros experimentos, cuando se compararon dos valoraciones con Pb(II) de una solución 10 μM de Zn₇-MT1 a pH 7.0, a diferentes temperaturas, 37 y 55 °C (Fig. 183), se observó que a la temperatura inferior, las señales espectroscópicas de DC y UV-vis son menos intensas y menos definidas.

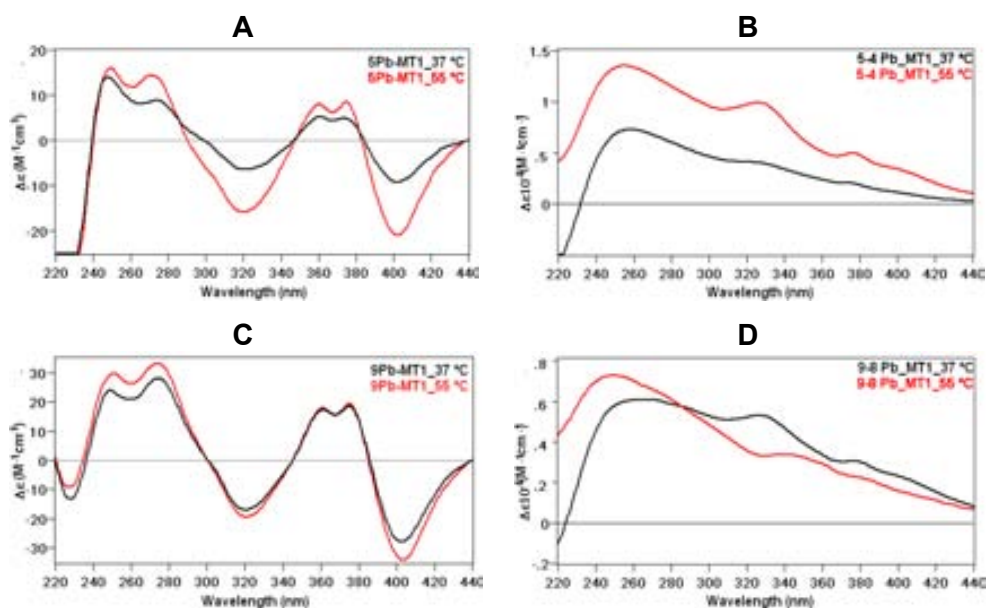


Figura 183. Comparaciones de los espectros de DC y de dif. UV-vis del (A y B) 5° y (C y D) 9° eq de Pb(II) de la valoración a 10 μM de Zn₇-MT1 a 37 y 55 °C a pH 7.0.

Además no se observan algunas de las absorciones presentes a 55 °C, como la de 290 nm en el espectro de DC o la de 400 nm del espectro de UV-vis en los primeros equivalentes añadidos (Fig. 183A-B). En cambio, hacia el final de la valoración (Fig. 183C-D) no existen diferencias significativas, ni en intensidad ni en las absorciones observadas. Esto puede ser debido a una diferencia en el plegamiento de la proteína alrededor de los iones Pb(II) añadidos al principio de la valoración, cuando los iones Zn(II) todavía están coordinados a la proteína, mientras que una vez los iones Zn(II) han sido desplazados, las especies formadas se muestran invariables con la temperatura.

Estos resultados obtenidos, juntamente con el hecho de que la variación de temperatura no provoca una diferencia en la saturación de la proteína, observada a partir del 9° eq de Pb(II) añadido, son indicativos de que la temperatura aparentemente no afecta a las especies Pb-MT1 formadas. Sin embargo, sí favorece a la facilidad de desplazar los iones Zn(II) inicialmente coordinados a la proteína, de manera que a temperaturas elevadas estos iones son más fáciles de desplazar, dando lugar a especies Pb-MT1 con una mayor quiralidad.

Evidentemente, como ya se ha comentado anteriormente, se pudo observar que el aumento de temperatura provoca que la proteína se pliegue más rápidamente alrededor del ión Pb(II) añadido y, por consecuencia, hay una disminución considerablemente del tiempo de estabilización de los primeros equivalentes de Pb(II) incorporados a Zn₇-MT1, tal y como se verá más adelante en el siguiente apartado.

3.3.2. Isoforma MT2

En las valoraciones de Zn₇-MT2 con Pb(II) se observó que la variación de temperatura tiene un efecto en la estructuración de las especies Pb-MT2 formadas y por tanto, en la evolución de los espectros al añadir Pb(II), en donde en condiciones de pH neutro a menor temperatura (25 °C) el t_{est} por eq de Pb(II) añadido es corto (entre 20 min y 1 hora) y la proteína no alcanza la estructuración máxima esperada, provocando que sólo aparezcan algunas absorciones. En cambio, al aumentar la temperatura a 37 °C aparecen nuevas absorciones y el t_{est} por eq de Pb(II) aumenta. A estas dos temperaturas las señales se saturan tras la adición del 10° eq de Pb(II) a Zn₇-MT2. Mientras que a 55 °C la proteína se satura para el 5° eq de Pb(II) y se observa que la solución se torna turbia, posiblemente por la precipitación de Pb(II).

Al comparar los espectros de DC (Fig. 184A-B) a las tres temperaturas: 25, 37 y 55 °C se observa que la proteína MT2 necesitaba más que 25 °C para estructurarse mayormente, pero tampoco una temperatura muy superior como 55 °C, ya que provoca una mayor saturación de la solución de proteína y termina precipitando el Pb(II).

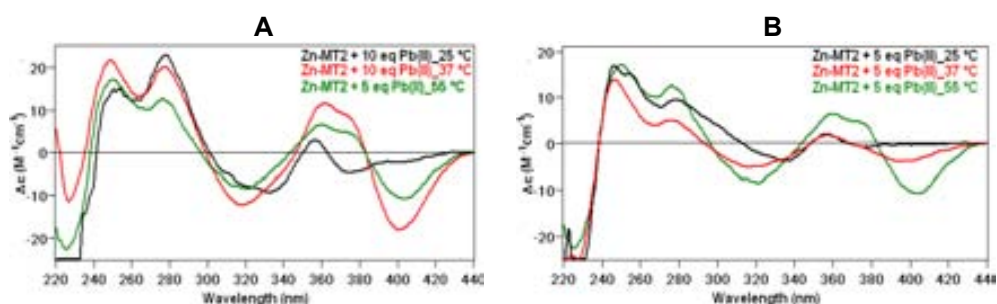


Figura 184. Comparación de los espectros de DC del (A) 10° eq de Pb(II) y (B) 5° eq de Pb(II) añadido en la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT2, a pH 7.0 a diferentes temperaturas 25, 37 y 55°C.

3.3.3. Isoforma MT3

En la valoración de Zn-MT3 con Pb(II) el aumento de temperatura provocó una disminución en el t_{est} por eq de Pb(II), que se puede observar en la Fig. 185 al comparar la evolución del 4° eq de Pb(II) añadido a Zn-MT3 a 25 °C que duró aproximadamente 14 horas (dejándolo una noche) y, en cambio, a 55 °C no hay una variación en la huella espectral respecto al t_{est} .

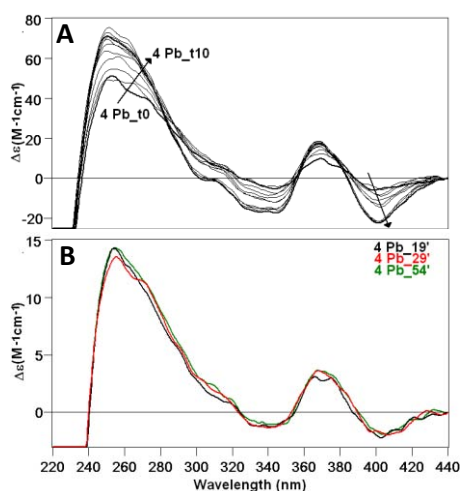


Figura 185. Espectros de DC de la evolución del 4° eq de Pb(II) añadido a una solución 10 μ M de Zn-MT3 a pH 4.5 a (A) 25 y (B) 55 °C.

En la Fig. 186, se puede observar que la variación de temperatura afecta a la intensidad de las señales espectroscópicas de DC en los primeros eq de Pb(II) añadidos, en cambio una vez saturada la proteína no se observa una notable diferencia en los espectros. Esto revela que la estructuración final de los clústeres Pb-MT3 no se ve afectada por el cambio de temperatura, tanto a pH 7.0 como a 4.5, que podría ser consecuencia de tener t_{est} cortos para cada eq de Pb(II) añadido a Zn-MT3.

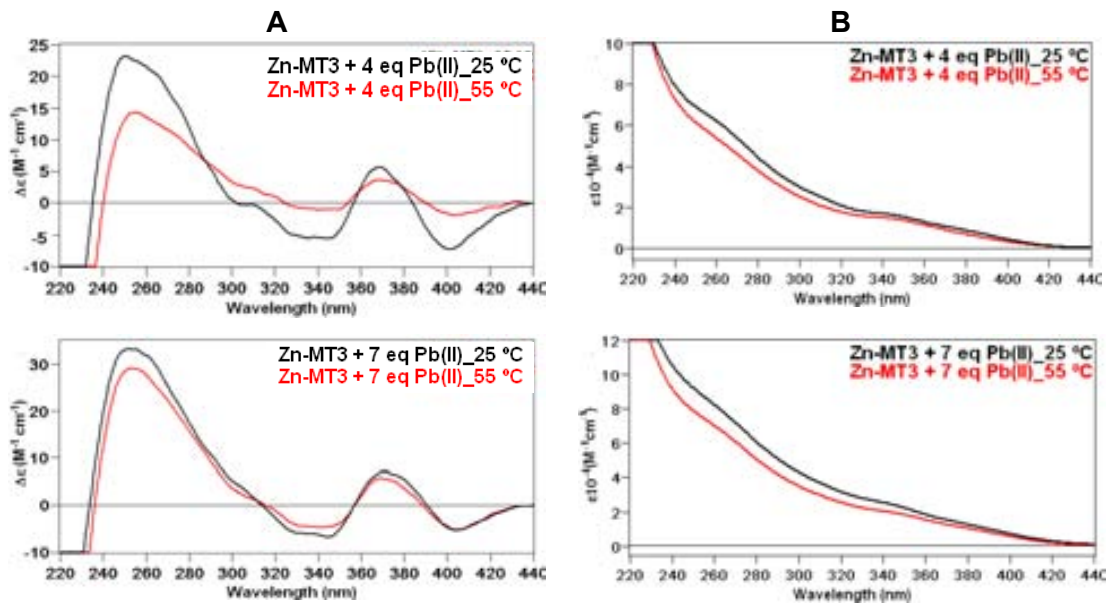


Figura 186. Espectros de (A) DC y (B) de UV-vis correspondientes al 4° (arriba) y 7° (abajo) eq de Pb(II) añadido a una solución 10 μM de Zn₇-MT3 en dos valoraciones a diferentes temperaturas 25 y 55 °C a pH 4.5.

En las condiciones de pH 7.0 se pudo observar que a 37 °C se obtiene la mayor intensidad de las absorciones por DC y UV-vis.

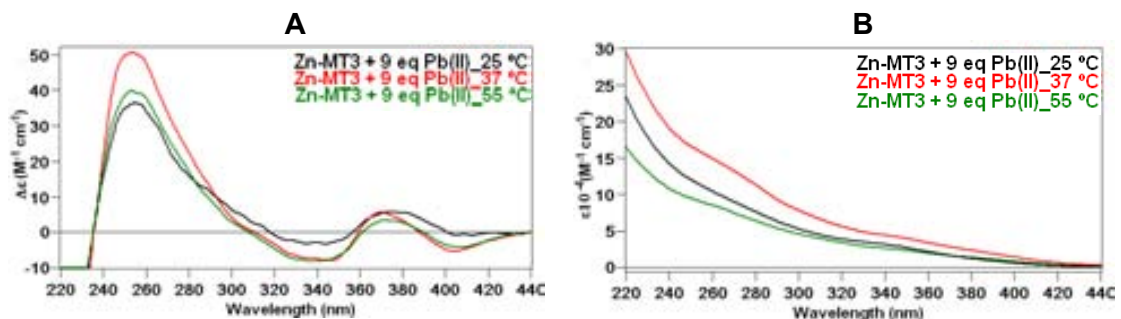


Figura 187. Espectros de (A) DC y (B) de UV-vis correspondientes al 9° eq de Pb(II) añadido a una solución 10 μM de Zn-MT3 en tres valoraciones a diferentes temperaturas 25, 37 y 55 °C a pH 7.0.

3.3.4. Isoforma MT4

En el estudio de Zn₇-MT4 con Pb(II) en condiciones de pH 4.5, se observó que el aumento de temperatura favorecía a la estabilización de las especies Pb-MT4 y esto llevó a una mayor estructuración de la proteína alrededor del ión Pb(II), tal y como se muestra en la Fig. 188. Mientras que, en condiciones similares a las fisiológicas (pH 7.0, 37 °C), el Pb(II) no se enlaza a MT4, incluso aumentando la temperatura sobre los 60 °C.

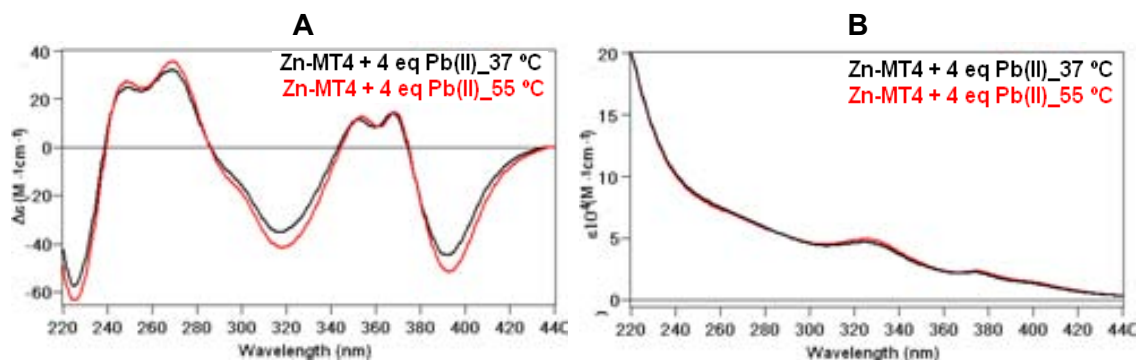


Figura 188. Comparaciones de los espectros de (A) DC y (B) UV-vis del 4^o eq de Pb(II) añadido a una solución 10 μM de Zn₇-MT4 a pH 4.5 registrado a dos temperaturas diferentes: 37 y 55 °C.

3.4. Efecto del tiempo de estabilización (t_{est})

El tiempo de estabilización se entiende como el tiempo necesario para que las señales de DC sean constantes tras una adición de solución metálica. En estudios anteriores, donde se estudiaba la interacción de MTs con iones como Cd(II) o Cu(I), los t_{est} eran relativamente cortos, entre 15 min y poco más de una hora. En cambio, en los estudios de la interacción del catión Pb(II) con la isoforma MT1 de mamífero³³⁵ ya se pudo observar que estos tiempos eran mucho más largos, incluso más de 24 horas en algunas adiciones. Como ya se ha comentado antes, estos tiempos pueden disminuir aumentando la temperatura, aún a riesgo de variar el comportamiento de la proteína. Pero es necesario estudiar los t_{est} observados en las diferentes valoraciones realizadas, anteriormente descritas en el apartado IV.2, para poder relacionar este factor con el comportamiento de las mismas frente al catión Pb(II).

3.4.1. Isoforma MT1

En la valoración de una solución 10 μM de Zn₇-MT1 a pH 4.5 y 25 °C, se observó que al adicionar el 1^o eq de Pb(II) las señales espectroscópicas (tanto de DC como de UV-vis) no se estabilizaban, aumentando su intensidad a medida que pasaba el tiempo hasta más de 12 horas después de la adición metálica (Fig. 189A-B).

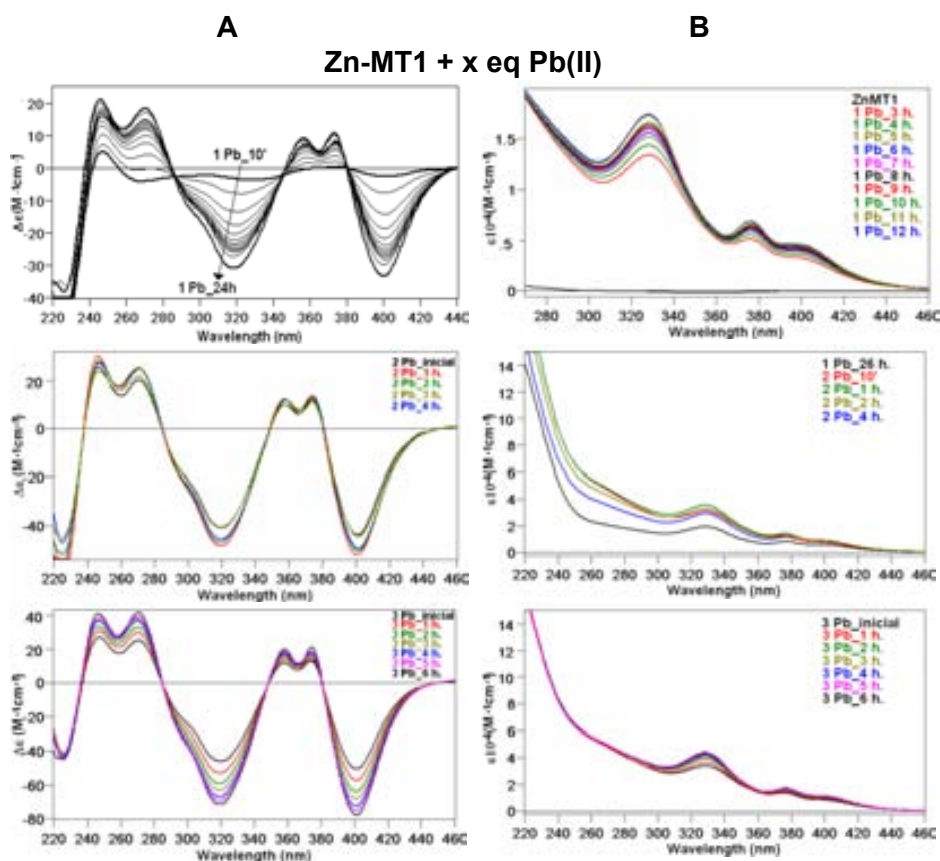


Figura 189. Espectros de (A) DC y (B) UV-vis correspondientes a la evolución del 1° a 25 °C, 2° y 3° eq de Pb(II) añadido a una solución 10 μ M de Zn₇-MT1 a pH 4.5, a 55 °C.

Al aumentar la temperatura de trabajo de 25 a 55 °C, tal y como se mencionó en la metodología, se aceleró la reacción (la estabilización del ión Pb(II) en la proteína), como era de esperar. A pesar de esto, los t_{est} siguen siendo largos; de alrededor de 24 h para el 1° eq de Pb(II), 4 h para el 2° eq de Pb(II), 6 h para el 3° eq de Pb(II), al menos para los tres primeros equivalentes de Pb(II), ya que para las siguientes adiciones de plomo (4° y 5° eq) estos tiempos disminuyen y una vez llegado al punto de saturación (a partir del 6° eq de Pb(II)) pueden tardar de 20 min a 1 h.

Este comportamiento se da marcadamente a concentraciones de 10 y 20 μ M a pH 4.5, en cambio para 5 μ M la estabilización de los iones Pb(II) no requiere un mayor tiempo. Así también, se puede observar que a pesar de haber aumentado la temperatura desde 25 hasta 55 °C los t_{est} para los tres primeros equivalentes de Pb(II) añadidos siguen siendo mayor a las posteriores adiciones de plomo(II) y también en comparación a las otras MTs (Fig. 190).

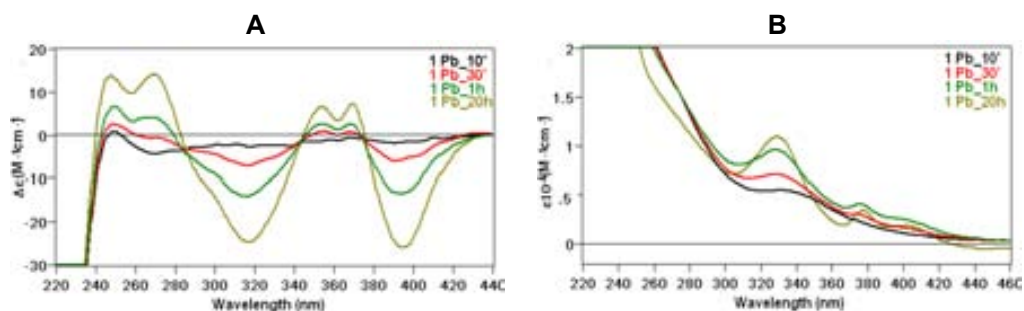


Figura 190. Espectros de (A) DC y (B) UV-vis correspondientes a la evolución del 1° eq de Pb(II) añadido a una solución 10 μ M de Zn₇-MT1 a pH 4.5, a 55 °C.

En la mayoría de las valoraciones con Pb(II) de Zn₇-MT1 se observó que los t_{est} de los tres primeros equivalentes de Pb(II) son más largos a las posteriores adiciones de Pb(II) a la proteína, tanto a pH 4.5 como a pH 7.0, tal como se puede observar en la Fig. 191. Esto puede indicar una compleja estructuración de Zn₇-MT1 al añadir los primeros iones Pb(II), provocando así éstos no se estabilicen fácilmente en la proteína. Una vez incorporado el 3° eq de Pb(II) la proteína se estructurará más rápidamente.

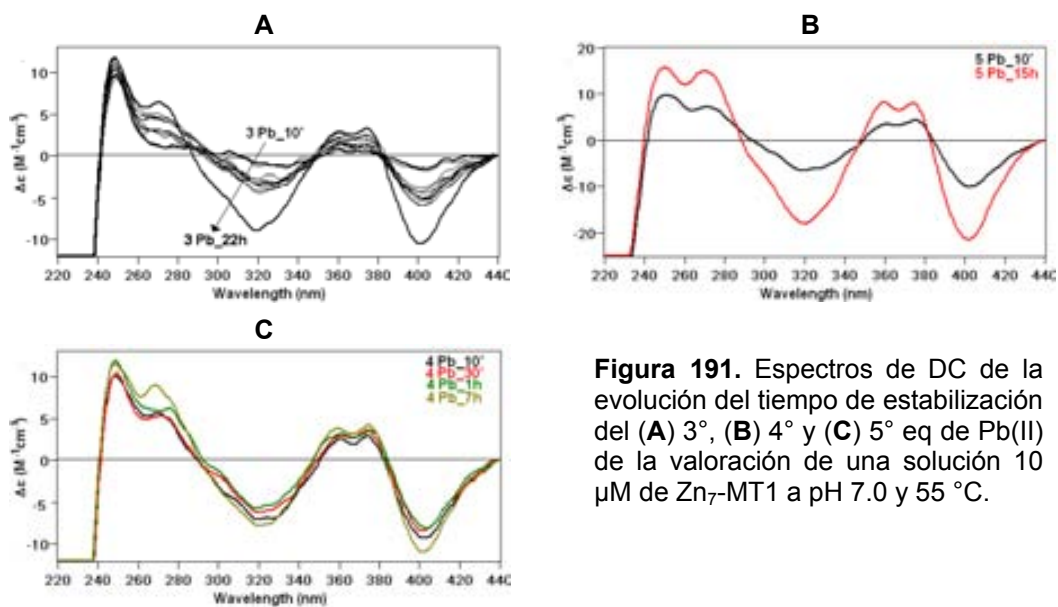


Figura 191. Espectros de DC de la evolución del tiempo de estabilización del (A) 3°, (B) 4° y (C) 5° eq de Pb(II) de la valoración de una solución 10 μ M de Zn₇-MT1 a pH 7.0 y 55 °C.

3.4.2. Isoforma MT2

En las valoraciones con Pb(II) de Zn₇-MT2 en condiciones similares a las fisiológicas; pH 7.0 y 37 °C, los tiempos de estabilización de los primeros equivalentes de Pb(II) añadidos son largos (para el 1°, 3° y 4° eq de Pb(II) se dejaron estabilizar una noche (21 h), para el 2° eq de Pb(II) hasta 6 horas), como también se observó para Pb-MT1. Pero a medida que se adicionan iones Pb(II) este tiempo disminuye; estabilizándose el 5° eq de Pb(II) a las 2 horas. En Zn₇-MT2 a pH 4.5 se observó que la adición del 1° hasta el 3° eq de Pb(II) necesitan t_{est} largos como se puede ver en la Fig. 192.

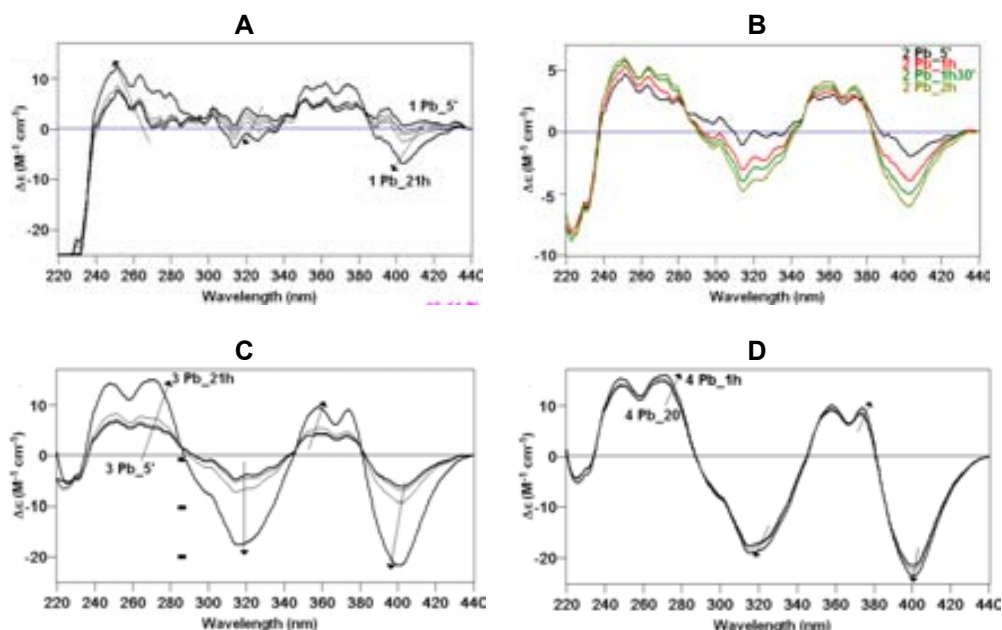
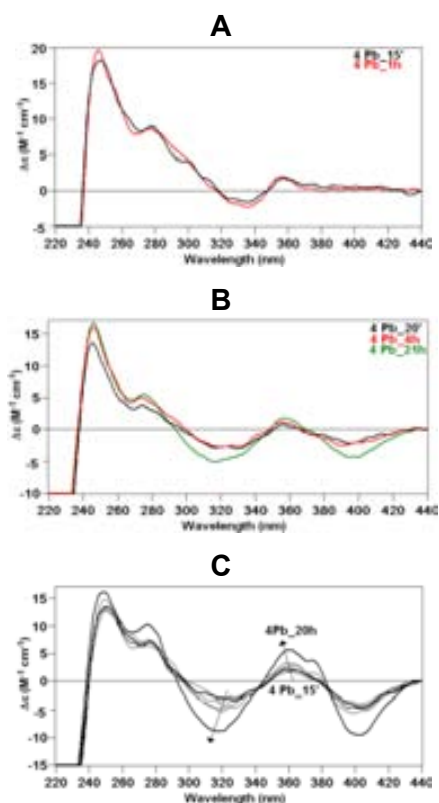


Figura 192. Espectros de DC de la evolución del t_{est} del (A) 1°, (B) 2°, (C) 3° y (D) 4° eq de Pb(II) añadidos en la valoración de una solución 10 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT2}$ a pH 4.5 y 37 °C.

Como se comentó anteriormente, a pH 7.0 se observó que el aumento de temperatura contribuye a una mayor estructuración de los complejos Pb-MT2 (Fig. 193), pero esto conlleva que el t_{est} por cada eq de Pb(II) añadido a la proteína es más largo cuando la temperatura es más elevada, al contrario de lo observado en $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ en presencia de Pb(II). En la Fig. 193 se muestran los t_{est} para el 4° eq de Pb(II) añadido a: 25 °C se estabiliza para 1 hora; para 37 y 55 °C sobre las 20 horas, pero en las condiciones similares a las fisiológicas las señales no alcanzan los máximos que se observan a 55 °C.

Figura 193. Espectros de DC de la evolución del t_{est} del 4° eq de Pb(II) a (A) 25, (B) 37 y (C) 55 °C de las valoraciones de una solución 10 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT2}$ a pH 7.0



3.4.3. Isoforma MT3

Así, al contrario de las isoformas MT1 y MT2, en MT3 los tiempos de estabilización por cada eq de Pb(II) añadido son cortos (de 10 min a 1 hora), y no influye en la estructuración de los clústeres Pb-MT3 (Fig. 194). La variación de temperatura no tuvo efecto en los t_{est} de los iones Pb(II) en la proteína.

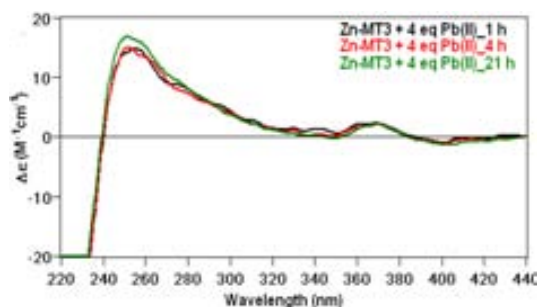


Figura 194. Espectros de DC de la evolución del t_{est} del 4º eq de Pb(II) añadido en la valoración de una solución 10 μ M de Zn-MT3 a pH 7.0 y 37 °C

3.4.4. Isoforma MT4

En MT4 al igual que en MT1 y MT2, se observó que los tiempos de estabilización de los iones Pb(II) añadidos a Zn₇-MT4 son largos (20 horas para el 1º eq de Pb(II)), si bien éstos disminuyen al aumentar la temperatura, a pH 4.5, tal como se ha mostrado anteriormente (Fig 188). En los tres primeros equivalentes de Pb(II) se puede observar que a medida que se deja un mayor t_{est} las señales se hacen más intensas y definidas (Fig. 195). A partir del 4º eq de Pb(II) añadido el t_{est} disminuye drásticamente.

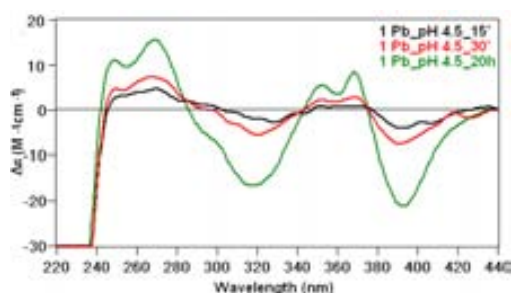


Figura 195. Espectros de DC de la evolución del 1º eq de Pb(II) añadido a una solución 10 μ M de Zn₇-MT4 a pH 4.5 y a 25 °C.

3.5. Efecto del exceso de Pb(II)

A las MTs se les han atribuido algunas funciones en relación al transporte de metales y como un mecanismo de detoxificación de iones metálicos, como Pb(II), Cd(II), Hg(II), Ag(I), etc. Así, es muy importante conocer su capacidad de enlazar dichos iones metálicos, así como estudiar su comportamiento frente a un exceso de iones metálicos una vez se ha saturado la proteína, básicamente si se ve afectada la estructuración de

los clústeres metal-MT formados o si aumenta el número de iones coordinados. En este caso se estudió la interacción del exceso de Pb(II) en las MTs ensayadas en esta Tesis Doctoral.

3.5.1. Isoforma MT1

En el caso de MT1 es importante indicar que el punto de saturación varía en función del pH, de manera que a pH 4.5 la proteína se satura tras el 5° eq Pb(II) añadido, mientras que a pH 7.0 se satura a partir del 9° eq Pb(II). La adición de una cantidad de Pb(II) superior al punto de saturación en las valoraciones a 5, 10 y 20 μM a pH 7.0, tanto a 37 como 55 $^{\circ}\text{C}$, provoca una desestructuración de la proteína y una disminución en la intensidad de las señales espectroscópicas de DC, mientras que en el UV-vis éstas se mantienen.

En la Fig. 196A, se puede observar que en la valoración a 5 μM , la saturación se da para 7 equivalentes de Pb(II), pero al añadir un exceso de 8 iones Pb(II) la señal de DC disminuye de intensidad, así también sucede a 10 μM (Fig. 196B) en donde al adicionar el 10° eq de Pb(II) las señales negativas pierden intensidad, por último a 20 μM (Fig. 196C) esto se observa más levemente.

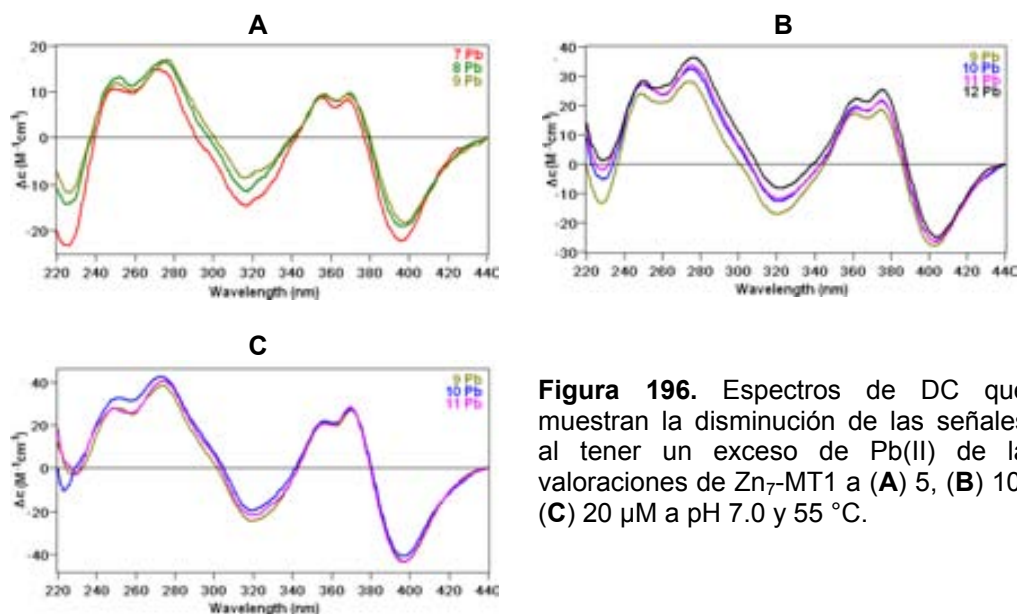


Figura 196. Espectros de DC que muestran la disminución de las señales al tener un exceso de Pb(II) de la valoraciones de Zn₇-MT1 a (A) 5, (B) 10, (C) 20 μM a pH 7.0 y 55 $^{\circ}\text{C}$.

Así también en la valoración a una concentración 5 μM de Zn₇-MT1 a pH 4.5 y 55 $^{\circ}\text{C}$, se muestra una disminución de sus señales de DC al añadir el 9° eq de Pb(II), tal como se puede ver en la Fig. 197. También se observó que la solución de proteína se torna un poco turbia debido a la precipitación de PbO sólo cuando se trabaja a pH 7.0, la diferencia de intensidades que se observan principalmente en los espectros de DC se puede deber a la formación de esta turbidez en la solución de MT1.

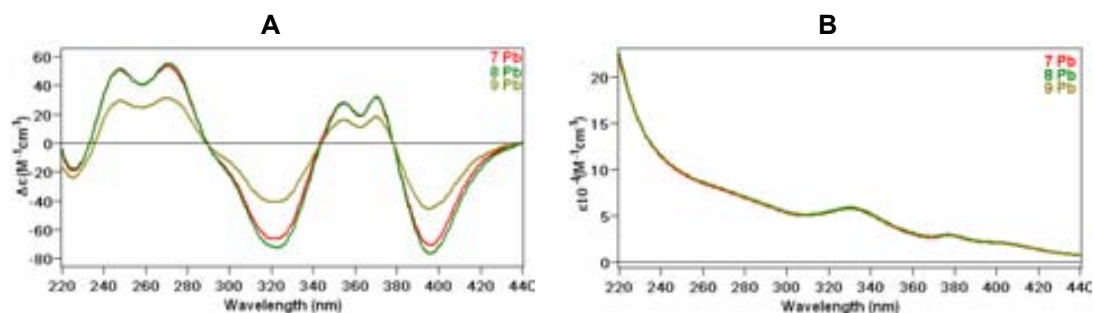


Figura 197. Espectros de DC y UV-vis de la valoración de una solución 5 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ con Pb(II) a pH 4.5 y 55 $^\circ\text{C}$.

Un dato importante que se observó en las valoraciones en todas las condiciones experimentales ensayadas, es que una vez se añade un exceso de iones Pb(II) los t_{est} son muy cortos. Como hemos visto el efecto del exceso de Pb(II) se da en todas las condiciones a pH 7.0, pero a pH 4.5 sólo se da a una baja concentración de proteína (5 μM), que podría tener relación con la menor quiralidad de las especies Pb-MT , es decir, la baja estructuración de la proteína, que sucede sólo en estos casos.

Por otra parte, en los experimentos de ESI-MS la adición de un exceso de Pb(II) (35 eq de Pb(II)) provoca principalmente la formación de especies homometálicas de Pb(II) : desde $\text{Pb}_7\text{-MT1}$ hasta $\text{Pb}_{10}\text{-MT1}$, las cuales son estables durante 24 horas (Fig. 51).

3.5.2. Isoforma MT2

En $\text{Zn}_7\text{-MT2}$ al incorporar el 10 $^\circ$ eq de Pb(II) se observó un desplazamiento de las señales de DC hacia arriba (Fig. 198A), que podrían indicar una leve desestructuración de la proteína o una disminución de la quiralidad de las especies Pb-MT2 formadas. En los espectros de UV-vis (Fig. 198B) no se muestra ningún efecto al añadir más Pb(II) , manteniendo la saturación de las señales.

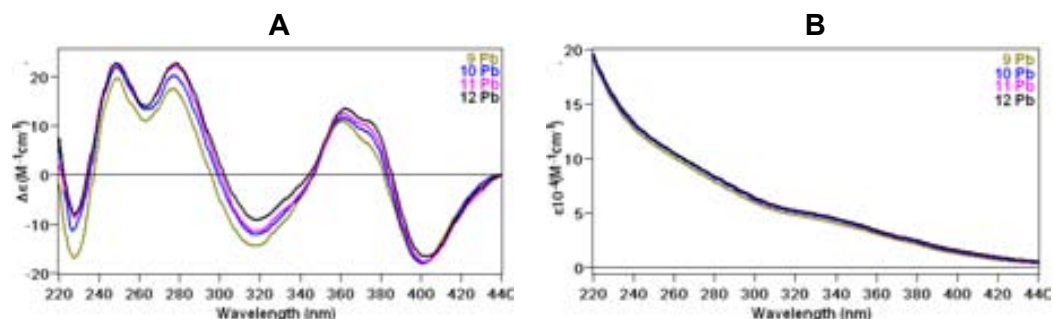


Figura 198. Espectros de (A) DC y (B) UV-vis registrados para el 9 $^\circ$ hasta el 12 $^\circ$ eq de Pb(II) añadido en la valoración de una solución 10 μM de $\text{Zn}_7\text{-MT2}$ a pH 7.0 y 37 $^\circ\text{C}$ con máx. t_{est} .

En los experimentos de ESI-MS se pudo observar que el exceso de Pb(II) provoca la disminución de especies heterometálicas de Pb,Zn-MT2 y se forman mayoritariamente especies homometálicas de Pb(II) , $\text{Pb}_9\text{-}$ y $\text{Pb}_{10}\text{-MT2}$ (Fig. 86).

3.5.3. Isoforma MT3

En esta proteína el exceso de Pb(II) añadido no mostró ningún efecto en los espectros de DC y UV-vis, manteniendo las señales de la saturación en la mayoría de los experimentos analizados. Pero en la valoración de Zn-MT3 en condiciones estándar de trabajo, 10 μM de proteína, a pH 4.5 y 25 $^{\circ}\text{C}$, se ha observado que al adicionar el 7 $^{\circ}$ eq de Pb(II) las absorciones del espectro de DC (Fig. 199) se desplazan hacia arriba y a partir del 8 $^{\circ}$ eq de Pb(II) tiene lugar la saturación de la proteína y para las posteriores adiciones de Pb(II) los espectros no varían.

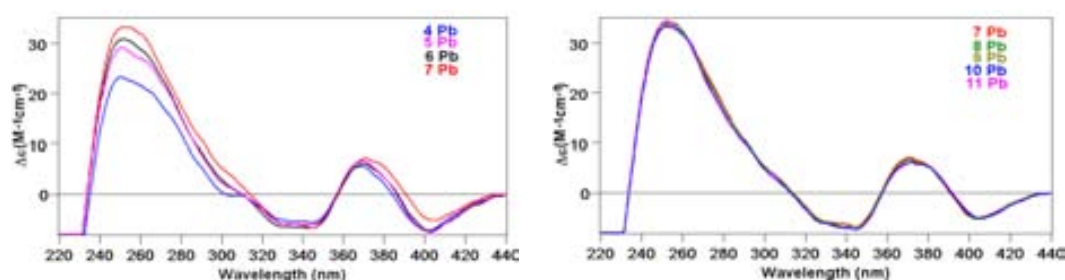


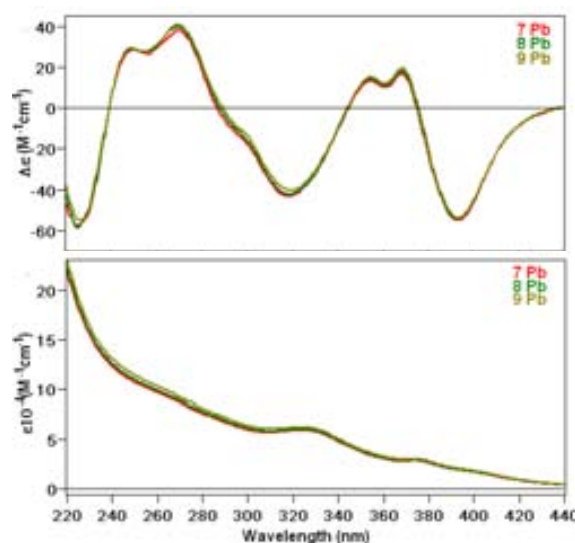
Figura 199. Espectros de DC desde el 4 $^{\circ}$ al 11 $^{\circ}$ eq de Pb(II) de la valoración de una solución 10 μM de Zn-MT3 a pH 4.5 y 25 $^{\circ}\text{C}$ con máx. t_{est} .

En los espectros de masas de Zn-MT3 en presencia de un exceso de Pb(II) se observó que las especies más abundantes son Pb₉- y Pb₁₀-MT3, y se forman más especies homometálicas con un mayor contenido de Pb(II) (Fig. 122).

3.5.4. Isoforma MT4

En la isoforma MT4, el exceso de iones Pb(II) a pH 4.5 no muestra ningún efecto después de la saturación de la proteína tras la adición de 7 eq de Pb(II), tal como se puede ver en los espectros de DC y UV-vis en la Fig. 200.

Figura 200. Espectros de DC (arriba) y UV-vis (abajo) del 7 $^{\circ}$, 8 $^{\circ}$ y 9 $^{\circ}$ eq de Pb(II) añadidos a Zn₇-MT4 a pH 4.5 y a 55 $^{\circ}\text{C}$.



Así también, a pH 7.0 la adición de exceso de iones Pb(II) no provoca la incorporación de este catión a Zn₇-MT4, como se puede observar en sus señales de DC (Fig. 201).

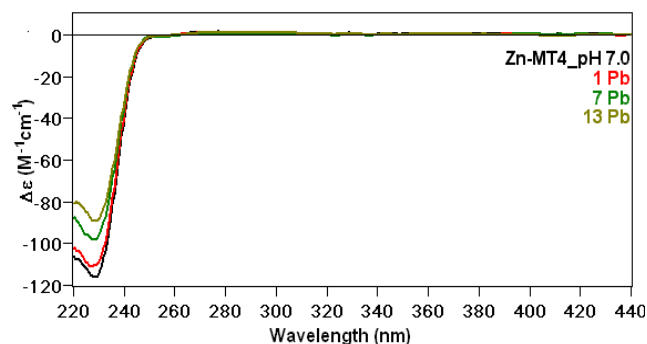


Figura 201. Espectros de DC del 1°, 7° y 13° eq de Pb(II) añadidos a Zn₇-MT4 a pH 7.0 y 37 °C.

3.6. Análisis global de los factores experimentales que afectan la capacidad coordinante de las MTs de mamífero frente a Pb(II)

A partir de los resultados mostrados en este apartado se puede hacer un análisis global de cuáles son los factores que influyen mayormente en la capacidad coordinante de estas proteínas frente a los iones Pb(II).

De acuerdo a esto, se puede concluir que la variable más influyente es el pH, seguida de la temperatura que está directamente relacionada con el tiempo de estabilización de los iones Pb(II) y por último la concentración de la proteína.

Se pudo observar que el pH afecta a la habilidad coordinante de las isoformas MT1, MT2 y MT4, con excepción de la MT del cerebro, MT3. Pero sólo MT4 no presenta coordinación del ión Pb(II) a pH 7.0.

Por su parte, la temperatura afecta a la cuatro MTs de mamífero, pero su efecto es más notable en MT2 en presencia de Pb(II), mostrando una variación de su huella espectral a las diferentes temperaturas.

Así también, el tiempo de estabilización de los iones Pb(II) añadidos influye en MT1, MT2 y MT4, ya que estas MTs tienen reacciones lentas, observándose que a t_{est} largos hay una mayor estructuración de los clústeres Pb-MT formados. Mientras que, en MT3 la incorporación de los iones Pb(II) sólo necesita t_{est} cortos, de manera similar que en la isoforma de levadura, Cup1.

Otro de los factores que tiene efecto en la interacción de Pb(II) a las MTs es la concentración de la proteína, que influye principalmente en la estructuración de los clústeres Pb-MT formados, en el siguiente orden: MT1 > MT2 >>>>MT3.

Por último, el exceso de plomo(II) añadido a las MTs estudiadas mostró un efecto sobre la capacidad coordinante frente a Pb(II) de manera importante en Zn₇-MT1 y Zn₇-MT2, siendo más leve para Zn-MT3. En cambio Zn₇-MT4 no se ve afectada por el exceso de Pb(II), en ninguno de los pHs ensayados (pH 7.0 y 4.5).

Por otra parte, se pudo encontrar una relación directa entre los tipos de absorción que aparecen tras la coordinación de Pb(II) a la metalotioneína, ya sea I y/o II, con los t_{est} de cada equivalente de Pb(II) añadido a las MTs. Los t_{est} largos se dan preferentemente en las MTs que presentan las señales de *tipo I* (cuatro bandas), en cambio los t_{est} cortos se dan cuando aparecen las dos bandas asignadas de *tipo II*.

De forma global, los espectros de UV-vis de la mayoría de las MTs estudiadas en presencia de Pb(II) no muestran un efecto del pH en el tipo de absorción que aparecen al coordinar el ión Pb(II).

4. Definición de un “modelo” de comportamiento fisiológico de cada isoforma de MT de mamífero frente a Pb(II)

Como se ha mostrado anteriormente, la coordinación de Pb(II) a las MTs de mamífero se puede ver afectada por una serie de factores (pH, temperatura, concentración de la proteína y tiempo de estabilización por eq de Pb(II)) que varía en función de la isoforma estudiada. De esta manera, es difícil establecer el posible papel detoxificador de estas proteínas en los organismos en condiciones que no sean las fisiológicas. Es por esto que para determinar la capacidad para detoxificar Pb(II) de las cuatro isoformas de mamífero (MT1, MT2, MT3 y MT4) es necesario tener en cuenta los resultados de los experimentos realizados en condiciones fisiológicas (pH 7.0 y 37 °C) ya descritos en el apartado IV-2. Así, en este apartado se comparan los resultados obtenidos en las cuatro isoformas, en las condiciones descritas, mediante las técnicas de espectroscopía (DC y UV-vis, Fig. 202) y espectrometría de masas (ESI-MS, Fig. 206).

Los resultados obtenidos por las espectroscopías de DC y UV-vis (Fig. 202) evidencian que al adicionar Pb(II) a las MTs de mamífero: Zn-MT1, -MT2 y -MT3 este ión se coordina y provoca que cada una de las proteínas se estructure de una manera específica. También se puede apreciar que Zn₇-MT1 y Zn₇-MT2 tienen un comportamiento análogo y a su vez diferente de la preparación Zn-MT3 cuando enlazan Pb(II) bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, al adicionar plomo a Zn₇-MT4 no se observa ningún cambio espectral, lo cual indica que no enlaza Pb(II) a pH neutro. De hecho, ya se ha descrito en el apartado anterior que MT4 sí enlaza Pb(II) a pH 4.5 (Fig. 147), ya que a este pH parte de los iones Zn(II) ya no están coordinados, siendo la especie mayoritaria Zn₄-MT4 (Fig. 37).

Observando con detalle los espectros de dicroísmo, se puede apreciar que Zn₇-MT1 y Zn₇-MT2 al coordinar Pb(II) (Fig. 202A-D) muestran unas señales de DC características muy similares, si bien no idénticas del todo, siendo las registradas para los clústeres Pb-MT1 significativamente más intensas que las de Pb-MT2. En ambos casos se observaron el mismo grupo de siete absorciones: 228(-), 246(+) y 271(+), 318(-), 358(+) y 375(+) y 400(-) nm. Éstas aumentan su intensidad a medida que se adicionan los sucesivos equivalentes de Pb(II), observándose tres puntos isodicroicos: 285, 347 y 380 nm, en las primeras adiciones realizadas. Así también, en los espectros de dif. UV-vis (Fig. 202C-E) se observaron la aparición de señales similares al enlazarse Pb(II) a Zn₇-MT1 y Zn₇-MT2, mostrando principalmente absorciones de *tipo II*: a 250 y 340-360 nm, que revelan la formación de los clústeres Pb-SCys₃ con una geometría piramidal trigonal. Pero al añadir el 3° equivalente de Pb(II) a Zn₇-MT1 se

observan nuevas bandas a 330 y 380 nm, que indican un cambio del entorno de coordinación (ver siguiente apartado IV-5).

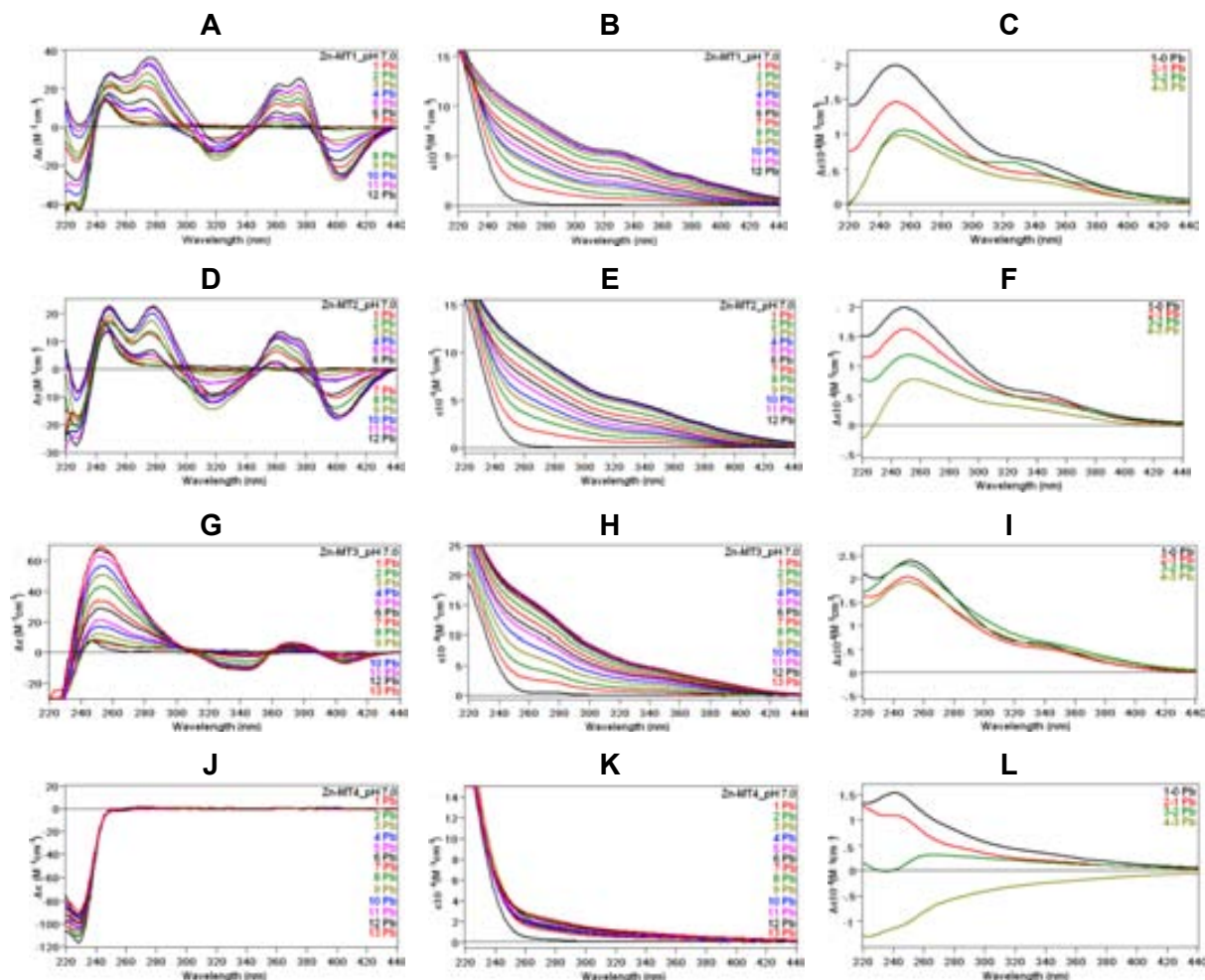


Figura 202. Espectros de DC, UV vis y dif. UV-vis (hasta el 4° eq de Pb(II)) registrados a lo largo de las valoraciones con Pb(II) de las soluciones 10 μ M de Zn₇-MT1 (A, B y C), Zn₇-MT2 (D, E y F), Zn-MT3 (G, H e I) y Zn₇-MT4 (J, K y L), respectivamente, en condiciones fisiológicas pH 7.0 y 37 °C.

Los espectros de DC obtenidos en la valoración de la preparación Zn-MT3 con Pb(II) a pH 7.0 y 37 °C muestran un comportamiento diferente comparado con los observados en Zn₇-MT1 y Zn₇-MT2 en presencia de Pb(II) en las mismas condiciones. Los espectros de DC (Fig. 202G) muestran básicamente cuatro absorciones muy anchas y poco definidas: 225(-), 245(+), 340(-), 375(+), y 400(-) nm. Las señales aumentan su intensidad, a medida que se incorporan los iones Pb(II) a Zn-MT3, mediante tres puntos isodicroicos: 300, 360 y 390 nm. Cabe destacar que si bien el máximo a 245(+) nm es muy intenso, más que los registrados en las valoraciones con Pb(II) de Zn₇-MT1 y -MT2, el resto de bandas tienen una intensidad menor, comparables a las obtenidas para MT2. En los espectros de dif. UV-vis (Fig. 202I) se observan similitudes en las absorciones de Zn-MT3 al enlazar Pb(II) respecto a Zn₇-MT1 y -MT2, tal como se puede observar en la Fig. 203.

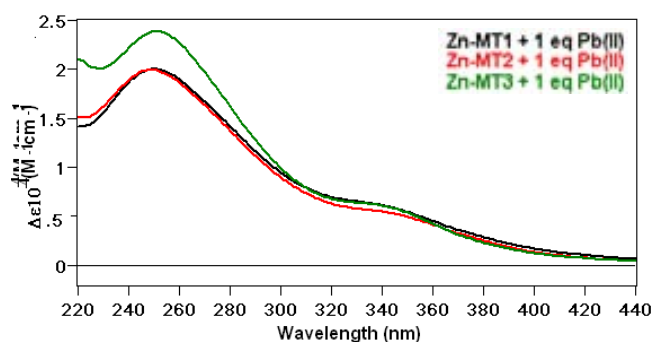


Figura 203. Espectros de dif. UV-vis del 1° eq de Pb(II) añadido a una solución 10 μM de Zn₇-MT1 (línea negra), Zn₇-MT2 (línea roja), Zn-MT3 (línea verde) a pH 7.0 y 37 °C.

Comparando las señales observadas en los espectros de DC (Fig. 204) para las valoraciones con Pb(II) de las tres isoformas (MT1, MT2 y MT3) se puede apreciar que, de hecho, existen una serie de absorciones comunes en todas ellas: 228(-), 246(+), 375(+) y 400(-) nm.

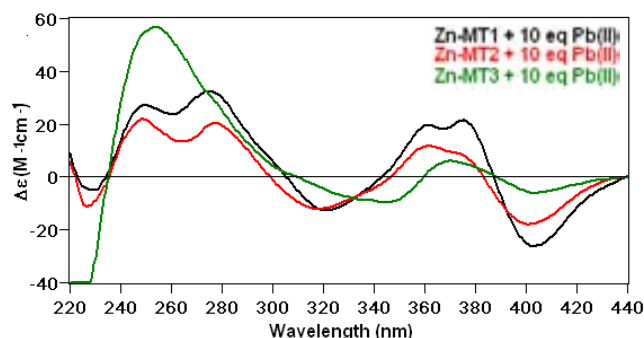


Figura 204. Espectros de DC del 10° equivalente de Pb(II) añadido a una solución 10 μM de Zn₇-MT1 (línea negra), Zn₇-MT2 (línea roja), Zn-MT3 (línea verde), a pH 7.0 y 37 °C.

Esta coincidencia en las absorciones es indicativa de que la estructuración de la proteína alrededor de los cationes Pb(II) enlazados tiene una cierta similitud en las tres isoformas, probablemente utilizarán los mismos residuos coordinantes en posiciones equivalentes. Las particularidades observadas para cada una de las isoformas (intensidad y absorciones diferenciadas) son muy probablemente consecuencia de las diferencias a nivel de estructura primaria de las mismas. Es por esto que en los espectros de dif. UV-vis de las tres isoformas se pueden observar absorciones semejantes entre ellas (Fig. 203). Comparando la evolución de los espectros UV-vis a longitudes de onda características (Fig. 205), se puede observar que Zn₇-MT1, Zn₇-MT2 y Zn-MT3 experimentan un cambio en la evolución espectral para 6 eq de Pb(II) añadidos, y saturan sus señales espectroscópicas aproximadamente entre 9 y 10 iones Pb(II). Estos datos muestran una relación con los obtenidos por ITC, descritos en los apartados anteriores (2.1.1.3, 2.2.1.3, 2.3.1.3, respectivamente), en donde para Zn₇-MT1 se observa que el número de iones Pb(II) coordinados son aproximadamente 9, para Zn₇-MT2 son 13, que revela un número de coordinación mayor, y para Zn-MT3 se

da para 6 iones Pb(II), similar al primer punto de saturación de las señales de DC y UV-vis.

Las semejanzas observadas por espectroscopía (DC y UV-vis) reflejan el hecho de que los residuos de Cys son los mayores responsables en la coordinación de Pb(II), y puesto que las tres isoformas tienen el mismo número de Cys y en posiciones relativamente similares, se saturan aproximadamente para el mismo número de iones Pb(II) (10° eq de Pb(II)) (Fig. 205). El conjunto de resultados también indica que, si bien otros residuos pueden participar en el enlace metálico, éstos no parecen determinar la capacidad coordinante de las proteínas consideradas, y solamente afectarían al tipo de coordinación y los cromóforos formados.

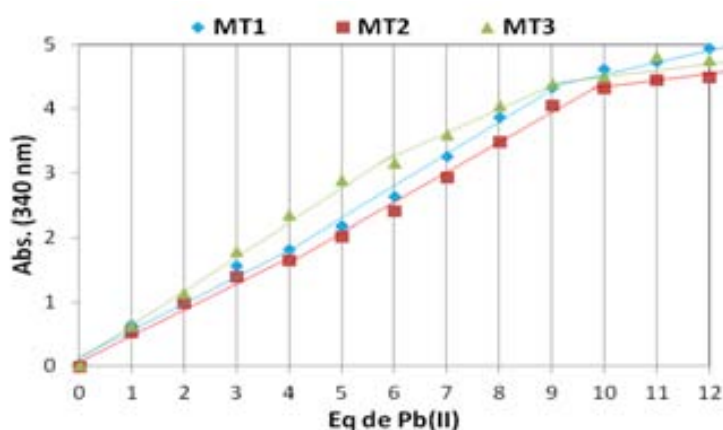


Figura 205. Evolución de las absorciones UV-vis a 340 nm para las valoraciones de Zn₇-MT1, Zn₇-MT2 y Zn-MT3 a 10 µM a pH 7.0 y 37 °C vs. eq de Pb(II) añadidos.

Como ya se ha visto en los apartados anteriores, los resultados espectroscópicos sólo muestran una visión parcial de la coordinación de Pb(II) a las MTs. Para completar estos datos cabe tener en cuenta los experimentos de ESI-MS registrados en las mismas condiciones (pH 7.0 y 37 °C) descritos en los apartados anteriores (2.1.1.2, 2.2.1.2, 2.3.1.2, 2.4.2) y que se recogen en la Fig. 206. Es importante recordar que el seguimiento por ESI-MS de las valoraciones con Pb(II) no es posible debido a la evolución que experimentan las soluciones de MT que contienen Pb(II).⁴² Por tanto, se compara el resultado de la evolución de los espectros de ESI-MS durante 24 horas tras la adición de 10 eq de Pb(II) a las cuatro isoformas de mamífero, manteniendo las soluciones a pH 7.0 y 37 °C a lo largo de todo el experimento.

Los resultados obtenidos en los experimentos seguidos por espectrometría de masas corroboran lo observado por DC y UV-vis, es decir, que mientras que MT1, MT2 y MT3 son capaces de coordinar Pb(II), formando diversas especies Pb-MT, la isoforma MT4 no coordina el Pb(II) añadido, y su especie inicial Zn₇-MT4 se mantiene invariante con el tiempo.

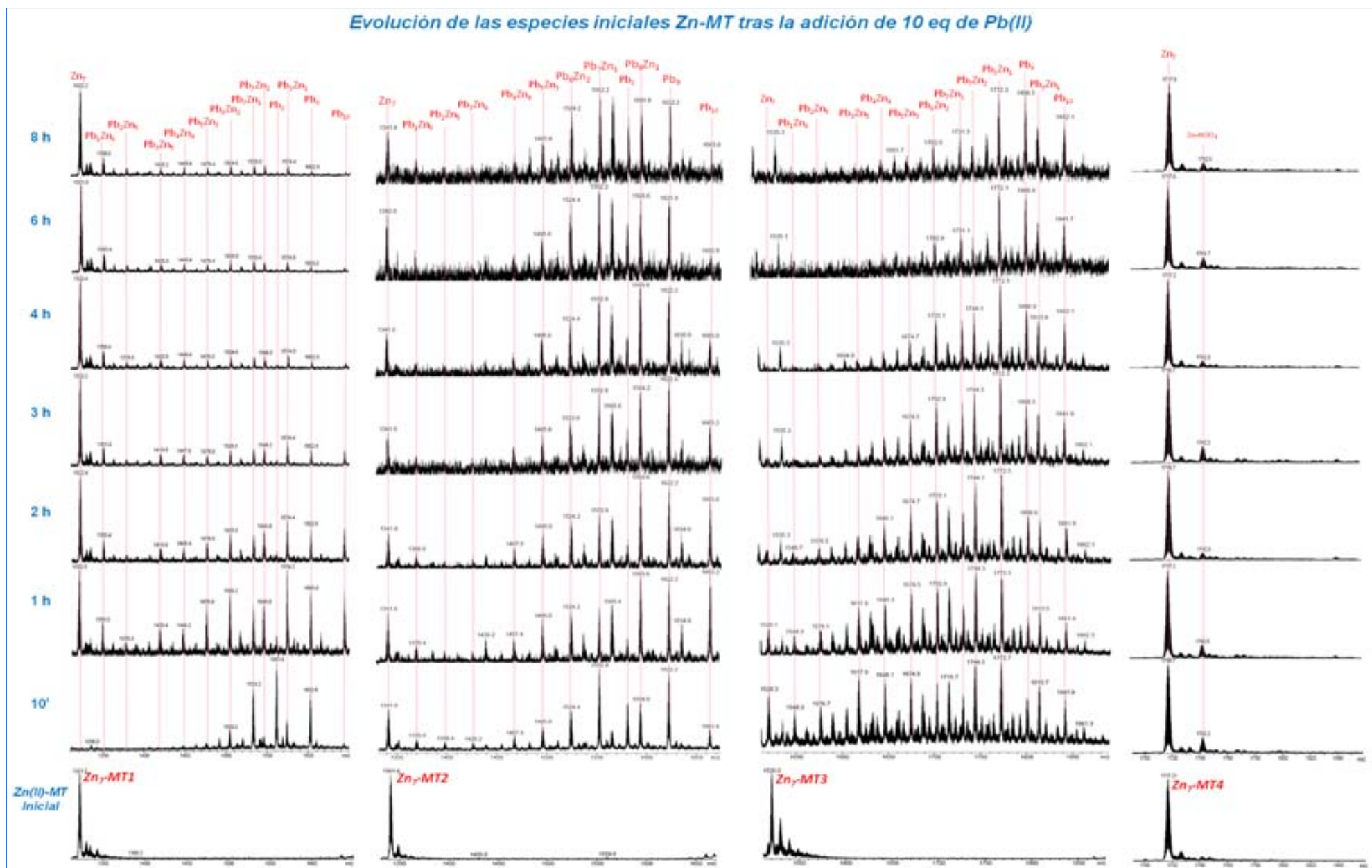


Figura 206. Espectros de ESI-MS registrados durante 8 horas que muestran la evolución de las soluciones de Zn₇-MT1, Zn₇-MT2, Zn₇-MT3 y Zn₇-MT4 a 10 μM, pH 7.0 y 37 °C, tras la adición de 10 eq de Pb(II). Los espectros muestran el estado de carga +5. Los correspondientes aductos de perclorato y amonio no se identifican.

Analizando con detalle los espectros de masas registrados tras la adición de 10 eq de Pb(II) a las tres MTs que enlazan estos iones: Zn₇-MT1, Zn₇-MT2 y la preparación Zn-MT3, se ha podido observar que en todos los casos se produce la formación de especies tanto homometálicas, Pb-MT, como heterometálicas, Pb,Zn-MT. A partir de la primera medida y sus posteriores, muestran que la evolución en el tiempo de las especies formadas depende de la proteína considerada.

Si se consideran las especies formadas a tiempo cero (primera medida justo después de la adición de metal) para las tres proteínas, se puede apreciar que, mientras que MT1 forma las especies Pb₇Zn₁-MT1, Pb₈-MT1 y Pb₉-MT1 (con total desaparición de la especie inicial de Zn₇-MT1), en el caso de MT2 y MT3 se pueden observar las correspondientes especies iniciales Zn-MT con una abundancia importante, además de otras especies que contienen Pb(II). Para MT2 las especies presentes en solución, además de la de partida, son Pb₇Zn₁⁻, Pb₈⁻, Pb₈Zn₁⁻, Pb₉⁻ y Pb₁₀-MT2. Por su parte, la adición de Pb(II) a Zn-MT3 provocó la formación de un gran número de especies con diversidad en el contenido metálico, más de 10 especies diferentes, sin observarse ninguna de especial abundancia. Así, teniendo en cuenta el comportamiento de estas proteínas en el primer contacto con el catión Pb(II), se puede considerar que MT1 es la que parece formar especies de mayor contenido en Pb(II) tras liberar la mayoría de sus iones Zn(II) inicialmente coordinados.

Cuando se compara el comportamiento de las soluciones descritas a lo largo del tiempo, las diferencias observadas todavía se acentúan más. En el caso de Zn₇-MT1 sólo después de 1 hora, las especies inicialmente formadas disminuyen su intensidad, para dar lugar a especies de menor contenido en Pb(II) y mayor contenido en Zn(II). Hasta que finalmente, al cabo de 2 horas el clúster inicial Zn₇-MT1 es el más abundante. Mientras que, el comportamiento de Zn₇-MT2 es totalmente diferente, ya que aumenta la intensidad de las especies con mayor contenido en Pb(II) las dos primeras horas, y después de 24 horas Pb₇Zn₁⁻, Pb₈Zn₁⁻ y Pb₉-MT2 siguen siendo las mayoritarias. El comportamiento de Zn-MT3 en las condiciones ensayadas es análogo al de Zn₇-MT2 en presencia de Pb(II), si bien la cinética es más lenta, ya que las especies observadas inicialmente van evolucionando de manera que aumenta la intensidad de las especies con mayor contenido en Pb(II). Al cabo de 24 horas las especies mayoritarias son Pb₈Zn₁⁻, Pb₉⁻ y Pb₁₀-MT3. En base a estos resultados, se puede considerar que a pH 7.0 y 37 °C, la presencia de un exceso de Pb(II) en las soluciones Zn-MT provoca que en un primer momento la isoforma MT1 forme especies con un alto contenido en Pb(II) que solamente tendrán existencia en un período de tiempo muy corto, mientras que MT2 es capaz de enlazar Pb(II) en un rango de tiempo ligeramente superior, entre 1 y 2 horas, dando lugar a especies estables con el tiempo, sin embargo, MT3 necesita hasta 12 horas para dar lugar a especies con un alto contenido en Pb(II).

Considerando las especies formadas con un mayor contenido metálico, cabe destacar que en todos los casos las especies Pb_9 - y Pb_{10} -MT toman especial importancia. Este hecho es especialmente interesante, ya que los pocos trabajos existentes en la bibliografía consideraban que la especie formada al valorar MT1 o MT2 era la correspondiente Pb_7 -MT,³³⁸ análoga a la especie de partida Zn_7 -MT. También es destacable la existencia de especies con alto contenido en $Pb(II)$ y sólo un ión $Zn(II)$, especialmente Pb_8Zn_1 -MT. La presencia de estas especies heterometálicas evidencia el hecho de que el catión $Pb(II)$ no es capaz de desplazar totalmente el $Zn(II)$ inicialmente coordinado a la proteína aún cuando existe un ligero exceso de $Pb(II)$ en solución, con lo cual, una vez más, la existencia de una única especie Pb_7 -MT pierde totalmente el sentido.

Los resultados anteriormente descritos indican, una vez más, que el comportamiento de las diferentes isoformas no solamente obedece a su contenido en Cys y su posición relativa, sino que además es importante el resto de aminoácidos de las correspondientes cadenas peptídicas.

El conjunto de los resultados obtenidos confirman que las MTs de mamífero, Zn -MT, muestran un comportamiento bastante diferenciado cuando enlazan $Pb(II)$. Claramente, Zn_7 -MT4 no puede enlazar $Pb(II)$, mientras que, Zn_7 -MT1, Zn_7 -MT2 y la preparación Zn -MT3 pueden coordinar hasta 10 iones $Pb(II)$ fácilmente. Estas tres proteínas a pesar de tener una capacidad coordinante similar para formar complejos de $Pb(II)$, se observó por medio de la monitorización por ESI-MS de las distintas reacciones Zn -MTx + $Pb(II)$ que el diferente carácter de Zn - vs. Cu -tioneína de cada isoforma³⁷ influye en esta habilidad de retener los iones $Pb(II)$ inicialmente enlazados. Interesantemente, entre todas las isoformas de MT de mamífero, MT3 es la que exhibe mejor habilidad para detoxificar $Pb(II)$, porque mantiene las especies Pb -MT3 a lo largo del tiempo (24 horas). Este resultado es especialmente relevante si se tiene en consideración que esta isoforma está presente únicamente en el SNC y los daños que puede provocar el plomo precisamente sobre sus estructuras fundamentales.

Así también, esta diferente capacidad coordinante de MT4 respecto a las otras MTs de mamífero y el hecho que MT4 es sintetizada en el tejido estratificado escamoso ha llevado a concluir que probablemente MT4 desarrolla funciones diferentes a las que realizan las otras MTs y que éstas no tienen relación con la detoxificación de $Pb(II)$ específicamente, sino más bien con el rol fisiológico específico del Cu dentro de este tipo celular, por su capacidad de enlazar este metal.^{194,196}

4.1. Estudios de competición de las isoformas de MT de mamífero con EDTA frente a Pb(II)

De acuerdo a los antecedentes bibliográficos, los agentes más comunes utilizados en la terapia de quelación para el tratamiento de envenenamiento con Pb(II) (y también con Hg) son: EDTA³⁴⁶ y DMSA. Además, la penicilina (PCA) y BAL son utilizados para quelatar Pb(II).^{347,348} El EDTA forma complejos especialmente fuertes con Mn(II), Cu(II), Fe(III), Pb(II) y Co(III).³⁴⁹

En base a los resultados observados por espectrometría de masas, se decidió realizar otros experimentos de ESI-MS con las isoformas MT2 y MT3, ya que como se observó anteriormente (Fig. 206), éstas son las que presentan una mayor capacidad detoxificadora frente a Pb(II) en condiciones fisiológicas (pH 7.0 y 37 °C), ya que mantienen coordinados los iones Pb(II) durante 24 horas.

Este nuevo estudio consistió en observar la interacción que tiene cada una de estas proteínas frente a Pb(II) en presencia de un quelante, como el EDTA. Para esto se realizaron dos experimentos de competencia de coordinación entre EDTA y las isoformas MT2 y MT3 frente a Pb(II):

- *El primer experimento* (Fig. 207) consistió en preparar dos soluciones de EDTA con 10 eq de Pb(II) (1:1) a pH 7.0. Éstas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, se añadieron las preparaciones Zn₇-MT2 y Zn-MT3 a las correspondientes soluciones hasta una concentración 10 μM, en condiciones de pH 7.0 y 37 °C. Se registraron los espectros de masas durante 24 horas (Fig. 209 y 210).

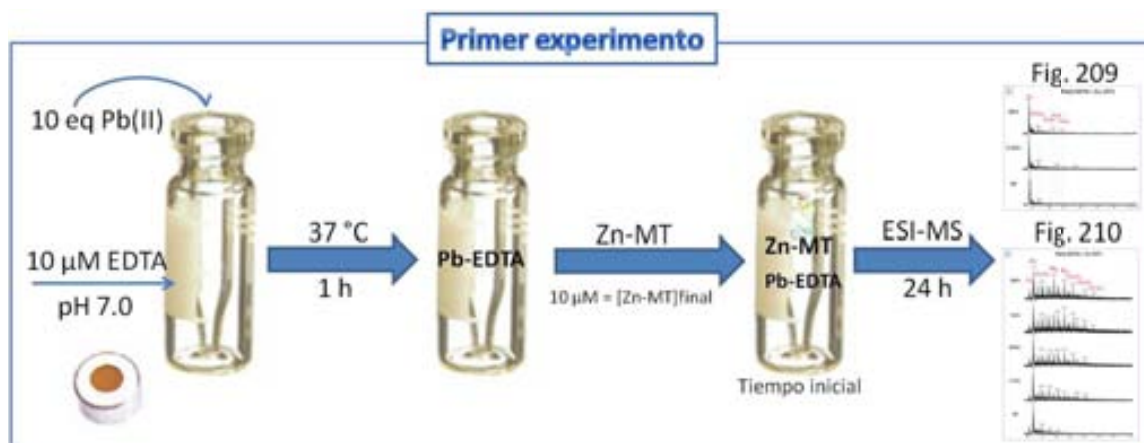


Figura 207. Esquema del primer experimento del estudio de competición de las isoformas de MT de mamífero MT2 y MT3, frente a EDTA.

El objetivo del primer experimento fue observar la capacidad de las metalotioneínas MT2 y MT3 para secuestrar los iones Pb(II) que previamente forman un complejo con EDTA.

Los resultados obtenidos del primer experimento revelan que Zn_7 -MT2 (Fig. 209) no compite por los iones $Pb(II)$ que están en solución con EDTA, ya que los espectros de masas muestran como especie más abundante la inicial Zn_7 -MT2 y se forman especies minoritarias como Pb_1Zn_6 -MT2, y otras no tan visibles como Pb_3Zn_4 -MT2 que se mantienen estables durante las 24 horas.

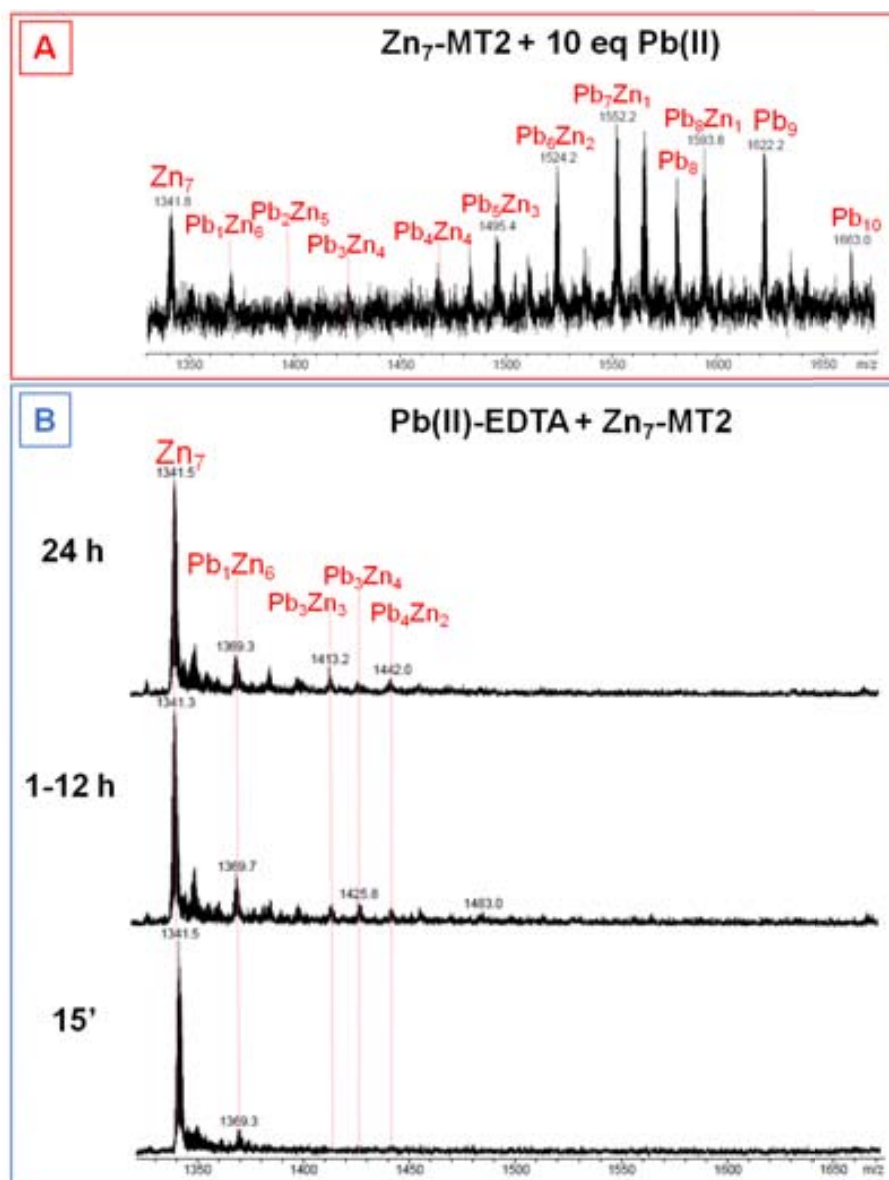


Figura 209. (A) Espectro de ESI de Zn_7 -MT2 tras añadir 10 eq de $Pb(II)$ (12 h) a pH 7.0 y 37 °C en ausencia de EDTA (Fig. 87). (B) Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la evolución de una solución 10 μM de EDTA con 10 eq de $Pb(II)$, a pH 7.0 y 37 °C, tras la adición de Zn_7 -MT2 (hasta ser una solución final de esta especie 10 μM). Los espectros muestran el estado de carga +5, señalando las especies más importantes.

Al contrario, la preparación Zn -MT3 (Fig. 210) muestra una mayor capacidad para coordinar los iones $Pb(II)$ en solución con EDTA, formando especies homo y heterometálicas que van desde Pb_1Zn_6 - hasta Pb_7Zn_1 -MT3. Aunque la especie más

abundante es una de las iniciales Zn₇-MT3, también se forman unas homometálicas de Pb(II), Pb₃-MT3 y Pb₄-MT3 con abundancia considerable.

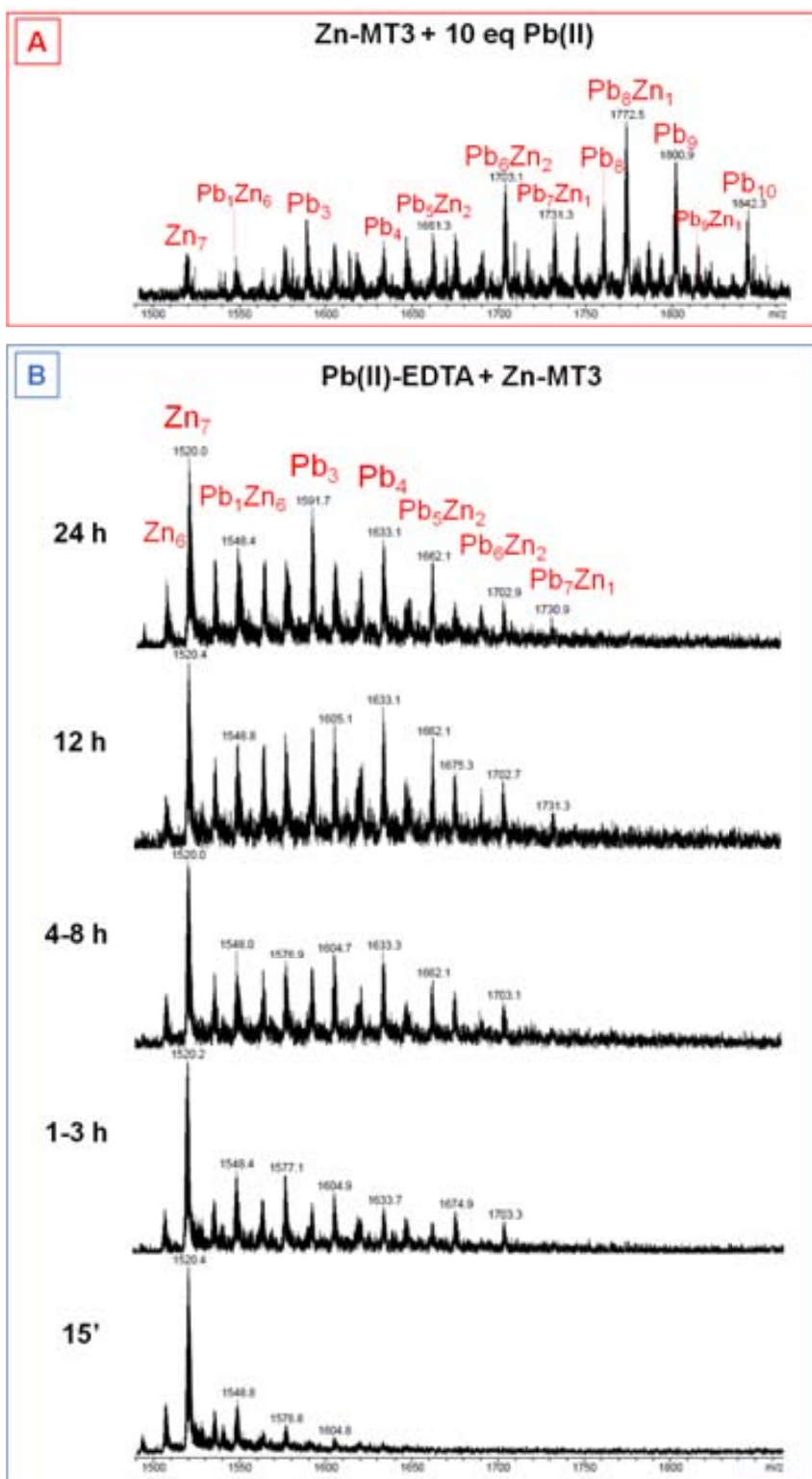


Figura 210. Espectros de ESI-MS registrados durante 24 horas que muestran la evolución de una solución 10 μ M de EDTA con 10 eq de Pb(II), a pH 7.0 y 37 $^{\circ}$ C, tras la adición de Zn-MT3 (hasta ser 10 μ M). Los espectros muestran el estado de carga +5, señalando las especies más importantes.

En los espectros de masas se observó que, a medida que pasa el tiempo, las especies de Pb(II) se hacen más abundantes y se forman clústeres con mayor número de iones Pb(II). Esto nos indica que MT3 va incorporando iones Pb(II) que estaban previamente en solución o coordinados a EDTA. Este comportamiento puede ser debido a una menor estabilidad de los clústeres Zn-MT3, en comparación con Zn₇-MT2, que podría explicar la diferencia en su habilidad coordinante frente a Pb(II).

- *El segundo experimento* (Fig. 208) consistió en preparar dos soluciones 10 μM de Zn₇-MT2 y Zn-MT3 a pH 7.0, a las cuales se le añadieron 10 equivalentes de Pb(II), dejándolas incubar a 37 °C durante 3 horas y registrando los espectros de masas correspondientes. Posteriormente, se agregaron 10 equivalentes de EDTA y se observó la evolución durante 5(MT2) y 7(MT3) horas por ESI (Fig. 211 y 212).



Figura 208. Esquema del segundo experimento del estudio de competición de las isoformas de MT de mamífero MT2 y MT3, frente a EDTA.

Por su parte, la finalidad de este experimento fue conocer si las proteínas, ya sea MT2 y MT3, son capaces de mantener los iones Pb(II) coordinados en presencia de EDTA.

Los resultados obtenidos muestran que en ambas preparaciones; Zn₇-MT2 (Fig. 211) y Zn-MT3 (Fig. 212), el EDTA interacciona tanto con los iones Pb(II) como los Zn(II). En un comienzo se observan especies heterometálicas Pb_xZn_y-MT (x+y = 7 y 8), similar a la especiación característica observada en otros experimentos de cada MT con Pb(II) (Fig. 87 y 123), pero a medida que pasa el tiempo de reacción con EDTA, los clústeres formados pasan a disminuir su contenido metálico, siendo los más abundantes Pb₁Zn₁-MT2 y Pb₁Zn₃⁻, Pb₁Zn₄-MT3. Además, se observan especies homometálicas con bajo contenido en Zn(II).

4. Definición de un "modelo" de comportamiento fisiológico de cada isoforma de MT de mamífero frente a Pb(II)

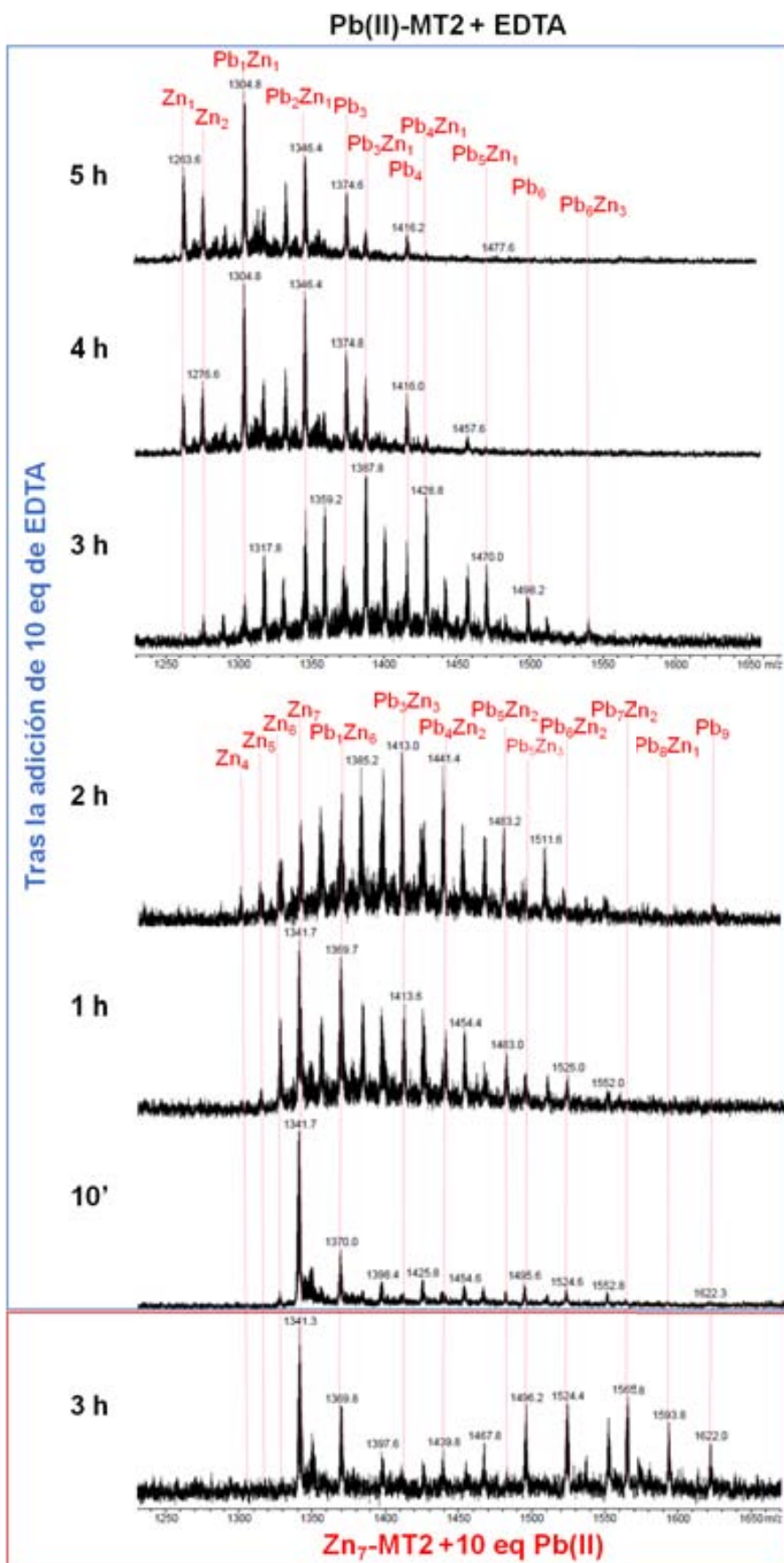


Figura 211. Espectros de ESI-MS registrados durante 5 horas que muestran la evolución de una solución 10 μ M de Zn₇-MT₂, a pH 7.0 y 37 °C, tras la adición de 10 eq de Pb(II) incubando hasta la 3 horas (cuadro rojo) y luego añadiendo 10 eq de EDTA (cuadro azul). Los espectros muestran el estado de carga +5, señalando las especies más importantes.

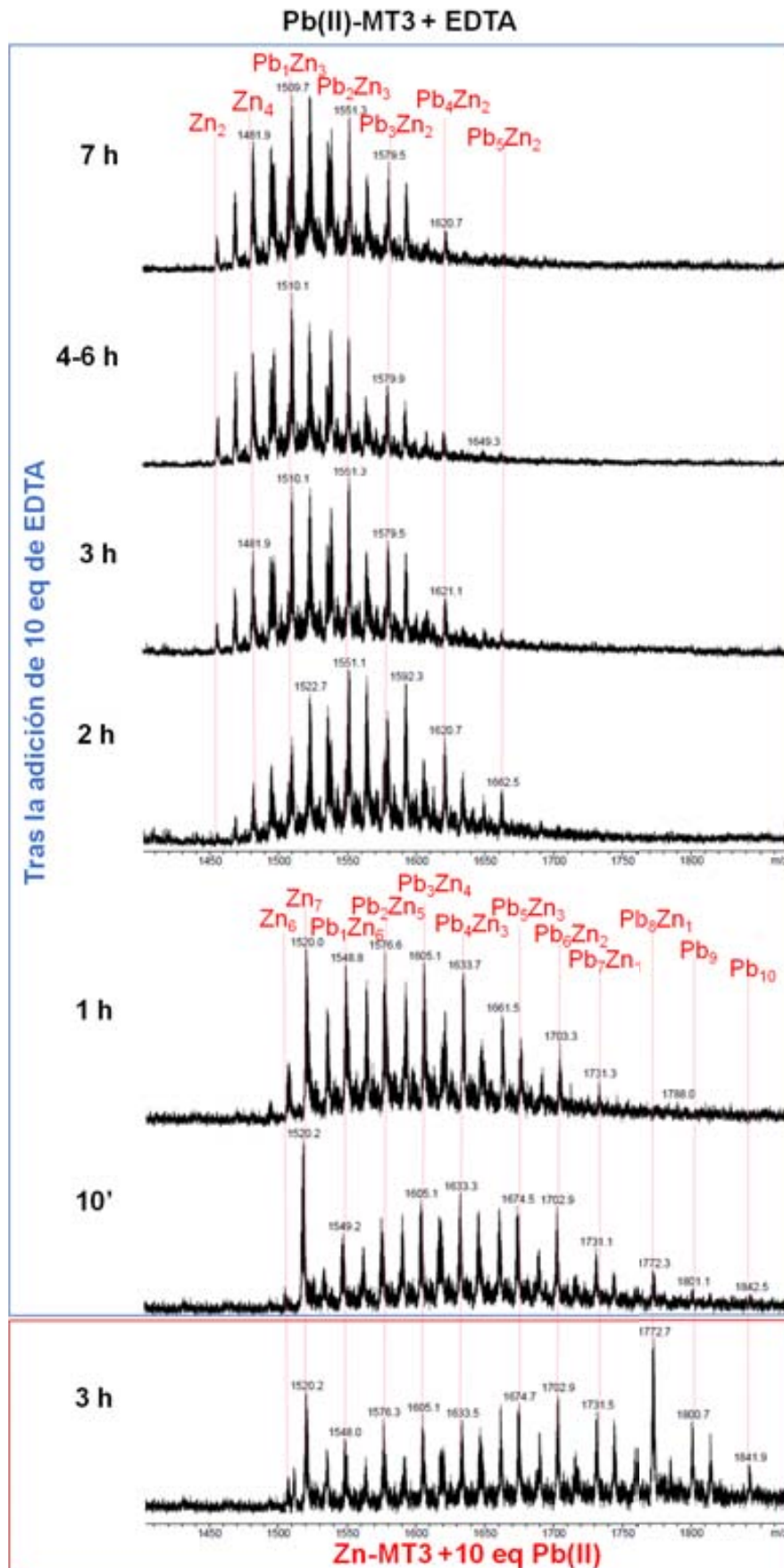


Figura 212. Espectros de ESI-MS registrados durante 7 horas que muestran la evolución de una solución 10 μM de Zn-MT3, a pH 7.0 y 37 $^{\circ}\text{C}$, tras la adición de 10 eq de Pb(II) incubando hasta la 3 horas (10') y añadiendo después 10 eq de EDTA. Los espectros muestran el estado de carga +5, señalando las especies más importantes.

En el caso de Zn₇-MT2, al cabo de 5 horas de reacción, se observan pocas especies que contengan Pb(II), siendo éstas tanto homometálicas (Pb₁⁻, Pb₂⁻, Pb₃⁻ y Pb₄-MT2) como heterometálicas (Pb₁Zn₁⁻, Pb₂Zn₁⁻, Pb₃Zn₁-MT2). Mientras que, en la preparación Zn-MT3 a partir de las 3 horas las especies heterometálicas (Pb₁Zn₂⁻, Pb₁Zn₃⁻, Pb₁Zn₄⁻, Pb₂Zn₂⁻, Pb₂Zn₃⁻, Pb₂Zn₄⁻, Pb₃Zn₂⁻, Pb₃Zn₃⁻ y Pb₄Zn₂-MT3) mantienen su abundancia. Estos resultados revelan que MT3 presenta una mayor estabilidad coordinante frente a Pb(II) que MT2, aún en presencia de un quelante de Pb(II) como EDTA.

Estos resultados demuestran, una vez más, que MT3 posee una mayor habilidad para coordinar Pb(II) en condiciones similares a las fisiológicas, incluso en presencia de EDTA. Mientras que MT2 limita su reactividad frente a Pb(II) por tener un carácter de Zn-tioneína que se refleja en una mayor estabilidad de la especie Zn-MT2.

5. Comparación del comportamiento de las diferentes MTs estudiadas frente a Pb(II). Discusión sobre el entorno de coordinación de este ión y su correlación con el carácter de Zn- o Cu-tioneína de cada MT y con los datos bibliográficos.

Como ya se ha comentado en la introducción, el ión Pb(II), a pesar de su configuración d^{10} , no es espectroscópicamente silencioso, al contrario que el Zn(II). La coordinación de Pb(II) a residuos de cisteínas en las proteínas muestra la aparición de varias bandas de absorción intensas en el UV-vis. Estas bandas de absorción se han utilizado para monitorear las interacciones Pb-proteína, pero todavía no se ha realizado un estudio detallado del origen de estas bandas electrónicas y su relación con la estructuración y la coordinación de plomo. La espectroscopía de fotoelectrones (XPS) sugiere que la asignación para la mayoría de las transiciones de compuestos Pb-tiolato es la transferencia de carga ligando-metal (TCLM). Cabe destacar, como ya se señaló en la introducción de esta Tesis, la elevada complejidad de la química de coordinación del catión Pb(II) (diferentes átomos dadores, diversidad de tipos de coordinación y geometrías).

De acuerdo con lo reportado respecto a las proteínas de unión a zinc, éstas se estructuran en dominios donde este ión adopta geometría tetraédrica. Cuando el Pb(II) se coordinaba a éstas se sugirió que inicialmente tenían una estructura tetracoordinada hemidirigida distorsionada.²¹³ Pero los estudios de rayos X sobre la coordinación de plomo(II) en sitios ricos en azufre,^{242,243,225,226} permitió concluir que, el modo de enlace preferido del Pb(II) es la tricoordinación, por medio de 3 Cys con una geometría piramidal trigonal (Fig. 34).

A continuación se procede a la comparación de los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral, comenzando con el comportamiento de las diferentes MTs estudiadas frente a Pb(II), para continuar con una comparación exhaustiva con los datos bibliográficos. Por último, se realiza una correlación entre el entorno de coordinación del ión Pb(II) y el carácter de Zn- o Cu-tioneína de cada MT.

5.1. Comparación del comportamiento de las MTs estudiadas frente a Pb(II)

En este apartado se comparan los resultados espectroscópicos de DC y UV-vis, de espectrometría de masas (ESI-MS) y microcalorimetría (ITC), obtenidos en el estudio sobre el comportamiento de las diversas isoformas de MT de mamífero frente a Pb(II).

5.1.1. Datos espectroscópicos

5.1.1.1. DC

El conjunto de datos obtenidos ha permitido observar que la coordinación de Pb(II) a las metalotioneínas da lugar a absorciones de DC particulares, mostrando en algunos casos una gran estructuración de la proteína cuando enlaza Pb(II), a diferencia de lo observado inicialmente en presencia de Zn(II) (y con otros iones como Cd(II) y Cu(I)). En algunas de las isoformas estudiadas las señales registradas pueden variar con el pH, la temperatura o el t_{est} .

A continuación se presenta una tabla que contiene las absorciones de DC de las MTs estudiadas frente a Pb(II) registradas en las condiciones óptimas de estructuración de la proteína, tanto a pH 4.5 como a pH 7.0.

	Absorción (nm)	
	pH 4.5	pH 7.0
Pb-MT1	225(-), 245-270(+), 317(-), 354-370(+), 395(-)	228(-), 250-275(+), 321(-), 361-376(+), 400(-)
Pb-αMT1	265(+), 306(+), 337(-), 371(+), 405(-)	228(-), 246(+), 273(-), 304(+), 343(-), 394(+)
Pb-βMT1	226(-), 246-270(+), 320(-), 358-375(+), 402(-)	228(-), 250-278(+), 325(-), 362-377(+), 406(-)
Pb-MT2	228(-), 248-271(+), 318(-), 358-374(+), 400(-)	228(-), 248-278(+), 318(-), 362-376(+), 402(-)
Pb-αMT2	-----	260(+), 288(-), 303(+), 340(-), 380(+), 401(-)
Pb-βMT2	-----	245(+)-276(+), 322(-), 360-376(+), 403(-)
Pb-MT3	254(+), 340(-), 375(+), 404(-)	254(+), 340(-), 375(+), 404(-)
Pb-αMT3	230(-), 261(+), 275(-), 300(+), 334(-), 375(+), 410(-)	230(-), 261(-), 273(-), 297(+), 335(-), 375(+)
Pb-βMT3	250(+), 290(+), 330(+), 375(+)	250(+), 292(+)-300(+), 375(+)
Pb-MT4	228(-), 246-271(+), 318(-), 358-375(+), 400(-)	228(-), espectro plano
Pb-Cup1	264(+), 295(-), 320(+), 350(-), 390(+)	258(+), 298(+), 320(+), 350(-)

Tabla 46. Máximos (+) y mínimos (-) de las absorciones observadas en los espectros de DC de las MTs estudiadas frente a Pb(II) en condiciones estándar de concentración de MT, a pH 4.5 y pH 7.0, a las temperaturas de máxima estabilización, una vez se ha saturado la proteína.

Algunas de las absorciones de DC provocadas por la coordinación Pb-MT como en el caso de Pb-MT1, -MT2, - β MT1 y -MT4 coinciden con las observadas en el estudio realizado por He^{336,337,339} de la apo -MT2 con Pb(II), como se pudo observar anteriormente en la Fig. 35. Por su parte, el enlace de Pb(II) a Zn-Cup1 muestra bandas similares a las reportadas por Merha en el estudio de fitoquelatinas (ver Fig. 33-2ab).³³⁰

Tal y como se puede observar en la Tabla 4.6, hay absorciones que coinciden en más de una MT al coordinar Pb(II), como los máximos positivos entre 234-283(+), otra 375(+), y una banda negativa cercana a 400(-) nm.

De acuerdo a esto, si comparamos los espectros de DC de Zn₇-MT1, Zn₇-MT2 y Zn₇-MT4 al enlazar Pb(II) a pH 4.5 (Fig. 21.3A), se puede observar la aparición de siete absorciones similares a 225(-), 246(+)-271(+), 318(-), 358(+)-375(+) y 400(-) nm, que reflejan una huella espectral análoga para las tres MTs. En cambio para la MT del cerebro, MT3, al coordinar los iones Pb(II) ésta da lugar a otras señales, indicando una estructuración diferente de las anteriores MTs, tal como se puede ver en la Fig. 21.3A (línea verde oliva). También se observó que a pH 7.0 (Fig. 21.3B) la coordinación de Pb(II) a Zn₇-MT1 y Zn₇-MT2 da lugar a las mismas absorciones, pero en cambio Zn₇-MT4 a este pH no enlaza Pb(II), mientras que Zn-MT3 muestra un comportamiento similar al observado a pH 4.5. Los espectros de DC de estas MTs en presencia de Pb(II) reflejan coincidencias en algunos rangos de longitud de onda, como las absorciones a 228(-), 246(+), 375(+) y 400(-) nm.

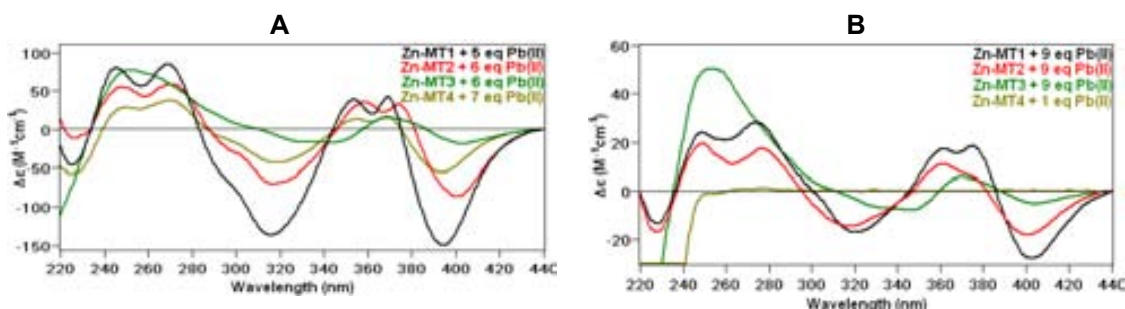


Figura 21.3. Espectros de DC de las cuatro MTs: Zn₇-MT1, Zn₇-MT2, la preparación Zn-MT3 y Zn₇-MT4 frente a los correspondientes iones Pb(II) que saturan cada una de estas proteínas, (A) a pH 4.5 en condiciones estándar de trabajo y (B) a pH 7.0 y 37 °C, (el espectro de MT3 (línea verde) está normalizado al multiplicarlo por 2.5 para alcanzar la intensidad de las otras señales).

Por otra parte, también se ha estudiado el comportamiento de los dominios Zn₄-αMT y Zn₃-βMT por separado de las isoformas, MT1, MT2 y MT3, frente a Pb(II). Éstos tras coordinar Pb(II) también muestran absorciones con ciertas similitudes.

Los espectros de DC de Zn₄-αMT al enlazar Pb(II) (Fig. 21.4) muestran huellas espectrales diferentes que varían con el pH, revelando que cada dominio tiene su particular estructuración frente a Pb(II). Pero sí se observa una similitud a pH 7.0 (Fig. 21.4A) en los máximos positivos a 360-390(+) nm y otro negativo entre 306-355(-) nm.

5. Comparación del comportamiento de las diferentes MTs estudiadas frente a Pb(II). Discusión sobre el entorno de coordinación de este ión y su correlación con el carácter de Zn- o Cu-tioneína de cada MT y con los datos bibliográficos

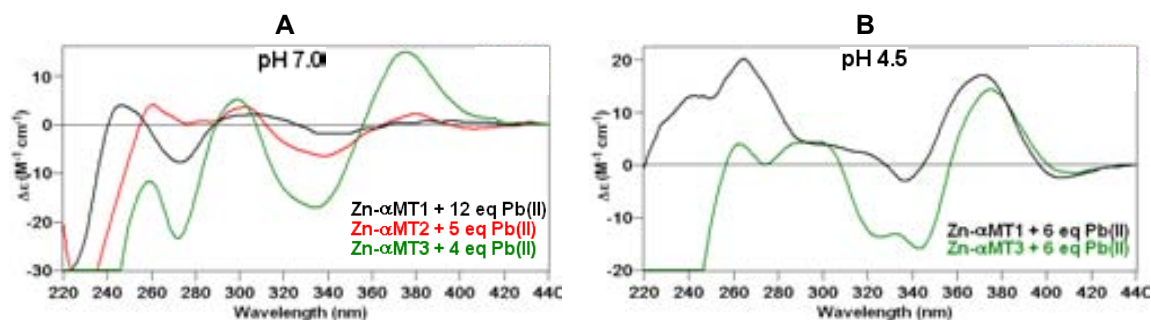


Figura 214. Espectros de DC registrados en las valoraciones de los dominios Zn₄-αMT frente a Pb(II) en condiciones de (A) pH 7.0: el 12° eq de Pb(II) añadido a -αMT1, el 4° eq de Pb(II) a -αMT3 a 37 °C y el 5° eq de Pb(II) a -αMT2 a 55 °C, (B) a pH 4.5 y 25 °C, el 6° eq de Pb(II) adicionado a -αMT1 y -αMT3, con excepción de -αMT2.

Los dominios Zn₄-αMT2 y -αMT3 al enlazar Pb(II) presentan una absorción similar a 298(+) nm, y entre Zn₄-αMT1 y -αMT3 se observa una banda negativa a 272(-) nm. Y a pH 4.5 (Fig. 214B), Zn₄-αMT1 y -αMT3 presentan máximos a 265(+), 340(-), 375(+) y 410(-) nm.

Sin embargo, en los correspondientes dominios Zn₃-βMT en presencia de Pb(II) sí se observa una mayor similitud en sus señales de DC, donde Zn₃-βMT1 y -βMT2 (Fig. 215A) se estructuran de manera análoga frente a Pb(II), mostrando absorciones semejantes a las de sus correspondientes proteínas enteras. En cambio, los espectros de DC de Zn₃-βMT3 (Fig. 215B) muestra señales diferentes revelando otra forma de estructurarse frente a Pb(II), donde sólo el máximo a 250(+) nm es comparable al de los otros fragmentos βMT.

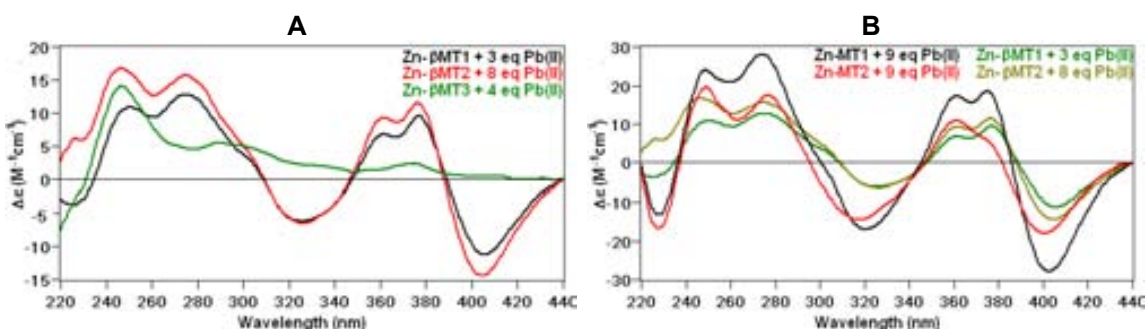


Figura 215. Espectros de DC de las dominios Zn₃-βMT1, -βMT2 y -βMT3 frente a Pb(II), (A) tras la adición de 3, 8 y 4 eq de Pb(II), respectivamente, a pH 7.0 y 37 °C; y (B) superposición de los espectros de Zn₃-βMT1, -βMT2, Zn₇-MT1 y -MT2 con los iones Pb(II) en el punto de saturación de la proteína.

En la comparación los espectros de DC obtenidos de las Zn-MT de mamífero y la Zn-Cup1 en presencia de Pb(II), conocida como la Cu-tioneína por excelencia, se pudo observar (Fig. 216) que estas proteínas no presentan una huella espectral similar, pero sí muestran señales que coinciden, como son la banda negativa a 228(-) nm y un

máximo cercano a 250(+) nm, que sugiere que podrían tener algunos sitios de unión de Pb(II) que son similares.

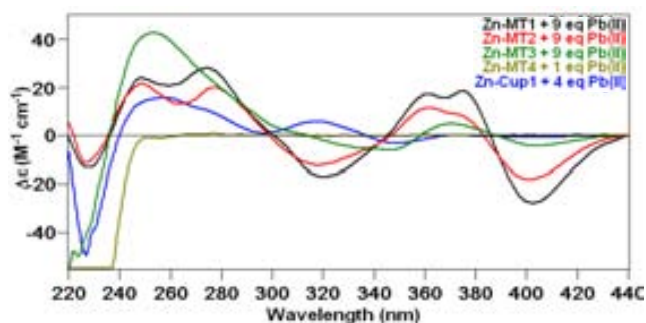


Figura 216. Espectros de DC de las Zn-MT estudiadas -MT1, -MT2, -MT3 y -MT4; y -Cup1 frente a Pb(II) en condiciones similares a las fisiológicas (pH 7.0, 37 °C) con excepción de Cup1 a 25 °C, una vez saturadas.

5.1.1.2. UV-vis

El estudio por espectroscopía de UV-visible de la habilidad coordinante de las MTs frente a Pb(II) reveló que el enlace Pb-MT da lugar a absorciones características en los espectros de UV-vis, y éstos varían en función de la proteína considerada. Los resultados obtenidos permitieron diferenciar dos grupos de absorciones: *tipo I*, que da lugar a cuatro bandas a 250, 330, 375 y 400 nm (Fig. 217A); y *tipo II*, con dos absorciones a 250 y 350 nm aprox. (Fig. 217B).

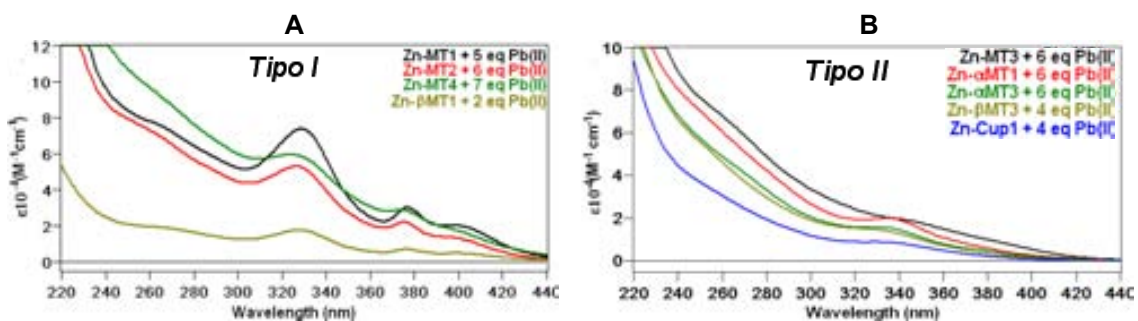


Figura 217. Espectros de UV-vis de las Zn-MT frente a Pb(II), (A) *tipo I*: MT1, MT2, MT4 y β MT1, (B) *tipo II*: MT3, α MT1, α MT3, β MT3 y Cup1, en condiciones estándar de trabajo a pH 4.5 y a diferentes temperaturas: 55 (MT1, MT3 y MT4), 25 (α MT, β MT y Cup1) y 37 °C (MT2) con los correspondientes equivalentes de Pb(II) que saturan cada proteína.

Estas absorciones también se observaron en algunos estudios presentados en la introducción, las de *tipo I*, aparecen en el estudio de la coordinación de Pb(II) a la apo-MT1/2 a pH 4.7 con cuatro señales a 250, 325, 375 y una banda débil a 400 nm.^{336,337,339} A su vez las de *tipo II*, aparecen tras la coordinación de Pb(II) a la apo-MT2 a pH neutro, así como se observaron en las fitoquelatinas, Pb-PC³³⁰ (250 y 330 nm) y también cuando se enlaza a las proteínas de zinc y algunos péptidos.^{243,285,286,310}

5. Comparación del comportamiento de las diferentes MTs estudiadas frente a Pb(II). Discusión sobre el entorno de coordinación de este ión y su correlación con el carácter de Zn- o Cu-tioneína de cada MT y con los datos bibliográficos

En el siguiente esquema se puede ver la relación del tipo de absorción de UV-vis que aparecen en cada una de las MTs tras la coordinación de Pb(II):

pH	Tipo de absorción		
	I	II'	II
4.5	MT1, MT2, MT4		MT3, Cup1 α MT1, α MT3
	β MT1		β MT3
7.0	MT1	MT2	MT4, MT3, Cup1 α MT1, α MT2, α MT3
	β MT1		β MT2, β MT3

Tabla 47. Tipos de absorción, sea I, II o variación de II', que se observan en los espectros de UV-vis de las Zn-MTs estudiadas frente a Pb(II) en condiciones de pH 4.5 y 7.0.

En base a los datos recogidos en la Tabla 47, cabe destacar que, la mayoría de estas proteínas muestran el mismo tipo de absorciones, aun que algunas de éstas varían en función del pH (MT2 y MT4).

MT2 se muestra como un caso particular, ya que si bien la adición de Pb(II) a pH ácido da lugar a las absorciones de *tipo I*, mientras que a pH neutro se observan otras bandas, a 260, 350 y una débil a 380 nm, que asignaremos como absorción de *tipo II'*, por ser similares a éstas.

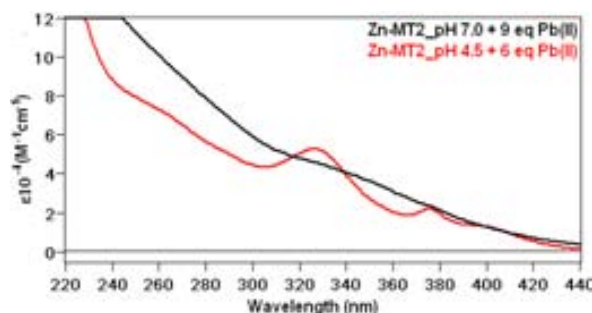


Figura 218. Comparación de los espectros de UV-vis de Zn₇-MT2 a 37 °C tras la adición del 9° eq de Pb(II) a pH 7.0 y del 6° eq de Pb(II) a pH 4.5.

Como se ha podido observar por UV-vis, hay dos tipos de absorciones características del enlace Pb-MT que nos podría indicar que este ión dentro de la proteína presenta más de un sitio de unión. Se pueden diferenciar en el tipo de coordinación, ya sea tetraédrica como los clústeres iniciales de Zn(II), o de forma tricoordinada con una geometría piramidal trigonal como se ha visto en la mayoría de las proteínas de Zn de Pb(II), diferenciándose en la cantidad de cisteínas que participan en la coordinación o incluso si intervienen otros ligandos.

Para profundizar más en la coordinación de Pb(II) en las MTs se realizó el estudio de los espectros de dif. UV-vis, ya que en los de UV-vis sólo se observa el aporte total de la coordinación del ión Pb(II) a las MTs y no se pueden apreciar las bandas que aparecen por contribución de cada uno de los equivalentes de Pb(II) añadidos a la proteína.

Tal y como era de esperar, en la mayoría de los espectros de diferencia de UV-vis de las valoraciones de las MTs estudiadas se observaron los dos grupos de absorciones, de *tipo I* (250, 330, 378 y 400 nm aprox.) y *II* (250 y 350 nm aprox.), pero el hecho de eliminar la absorción del conjunto de cromóforos y solamente poder observar las absorciones provocadas por cada adición en particular permite observar algunas variaciones de éstas (Tabla 52, Fig. 219C-D).

Como se pueden observar en los espectros de dif. UV-vis que se muestran en la Fig. 219 hay diferentes absorciones que aparecen cuando el ión Pb(II) se coordina a las MTs y éstas pueden variar en algunos casos según las condiciones experimentales, los dos tipos de señales, I y II, reflejadas en los espectros de UV-vis se muestran en Fig. 219A-B, respectivamente. Y en C y D se muestran otro tipo de bandas que no son visibles en el UV-vis.

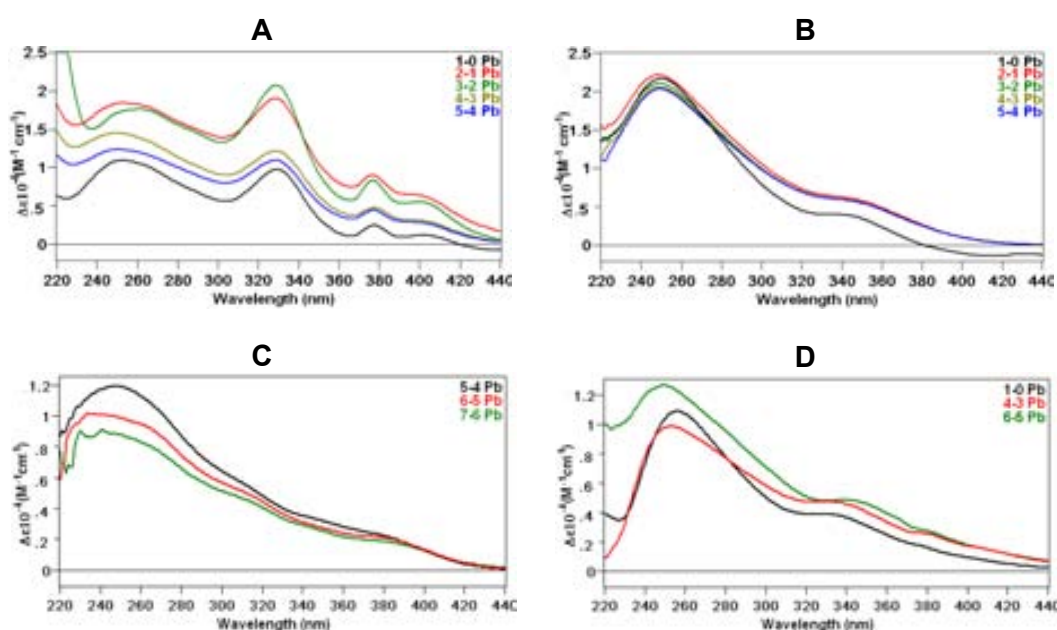


Figura 219. Diferentes tipos de absorciones observadas en los espectros de dif. UV-vis en las valoraciones de diversas Zn-MT con Pb(II). En (A) se muestran las cuatro bandas de *tipo I* (Zn_7 -MT1 a $10 \mu M$, pH 4.5, $55 \text{ }^\circ C$); en (B) las dos absorciones de *tipo II* (Zn_7 -MT2 a $10 \mu M$, pH 7.0, $25 \text{ }^\circ C$); y algunas variaciones de estas absorciones en (C) 250, 315, 385 nm, (la preparación Zn -MT3 a $20 \mu M$, pH 4.5, $55 \text{ }^\circ C$) y (D) 255, 337, 381 nm (Zn_7 -MT1 a $20 \mu M$, pH 7.0, $55 \text{ }^\circ C$).

Los espectros de dif. UV-vis de Zn_7 -MT1 frente a Pb(II) en las diferentes condiciones ensayadas, presenta los dos tipos de absorciones, ya sea *I* y/o *II*. Como se muestra en la Tabla 48, a pH 4.5 se observan de preferencia las bandas de *tipo I*, aunque también

algunas de *tipo II* y otras señales. Y a pH 7.0, para los dos primeros equivalentes de Pb(II) añadidos aparecen principalmente las de *tipo II* y luego varían estas señales. Sin embargo, la adición del 3° y 5° eq de Pb(II) son indiferentes a las condiciones de pH y siempre muestran las bandas de *tipo I*. Se puede ver que el pH afecta el modo de coordinación que prefiere cada ión Pb(II) dentro de la proteína, pero aún así independiente del pH las señales de *tipo I* son las que se reflejan en los espectros de UV-vis.

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)									
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8	
20	55	4.5	√	√	√	√	√	x'	x	√'	√'	
10	55	4.5	√	√	√	√	√	√'	x'	√	√	
5	55	4.5	√	x'	√	x	√	√'	x'	x	-	
5	55	7.0	x	x	√'	√'	√'	x'	√	x'	x'	
10	37	7.0	x	x	√	x	√	√'	√	√	√	
10	55	7.0	x	x	√	x	√	x	√	√	x'	
20	55	7.0	x'	√	√	x'	√	x'	√	x	x'	

Tabla 48. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en las valoraciones de Zn₇-MT1 a diferentes condiciones experimentales. Las bandas de *tipo I*: 250, 330, 375 y 400 nm se representan con el símbolo √ y las de *tipo II*, 250 y 350 nm con una x. Otras variaciones son √' que presentan una o dos señales de *tipo I*, sea 330 y/o 375 nm, así también x' indica las bandas a 250 y/o 350, además de otra a 385 nm aprox.

En cuanto a los dominios de Zn₇-MT1, se pudo observar que Zn₄- α MT1 presenta las mismas absorciones (*tipo II*) que en el UV-vis, pero como excepción se observó que la incorporación del 5° eq de Pb(II) a pH 4.5 forma señales de *tipo I*. Por su parte, en el dominio Zn₃- β MT1 se observaron los dos tipos de absorciones y otras variaciones de estas señales, donde se puede destacar que el 1° eq de Pb(II) coordinado reveló una clara influencia del pH en su modo de coordinarse, ya que a pH 4.5 muestra absorciones de *tipo I*, en cambio a pH 7.0 son de *tipo II*. Sin embargo, para el 2° eq de Pb(II) enlazado sólo se muestran las de *tipo I*, independiente del pH.

Los espectros de dif. UV-vis de las valoraciones de Zn₇-MT2 con Pb(II) muestran que la coordinación de estos iones provocan la aparición de dos grupos de absorciones (*tipo I* y *II*), tal como se puede observar en la Tabla 49. Además se puede ver un efecto del pH en la variación de las señales que aparecen, en donde a pH 4.5 se observan las bandas de *tipo I* igualmente observadas en el UV-vis, en cambio a pH 7.0 son de preferencia las de *tipo II*. Sin embargo, a pH neutro se observó que algunas adiciones de Pb(II) presentan otras absorciones, como por ejemplo, el 5° eq de Pb(II) añadido a 37 °C (20 μM) muestra las bandas de *tipo I*.

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
10	37	4.5	√	√	√	√	√	√'	√	x'	X'
10	37	7.0	x	x	x	x	x	√'	√'	√'	√'
20	37	7.0	x	x	√'	x	√	x	x	x	x
5	37	7.0	x	x	x	x	x	x	x'	x'	x'
10	25	7.0	x	x	x	x	x	x	x	x	-
10	55	7.0	x	√'	x	√'	x	x	-	-	-

Tabla 49. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en las valoraciones de Zn₇-MT2 a diferentes condiciones experimentales. Las bandas de *tipo I*: 250, 330, 375 y 400 nm se representan con el símbolo √ y las de *tipo II*, 258 y 350 nm con una x. Variaciones √': 255, 330 y 378 nm y x': 250, 350, 370 nm aprox.

En los dominios de MT2 en presencia de Pb(II), Zn₄- α MT2 no presenta variaciones de las absorciones de UV-vis, pero sí Zn₃- β MT2 donde se observaron nuevas absorciones en los espectros de dif. UV-vis. En éstos se muestran de preferencia las señales de *tipo II*, específicamente en las condiciones de 25 °C, pero hay un efecto de la temperatura en la variación de las bandas, ya que a 37 y 55 °C aparecen los dos tipos (*I*, *II* y *variación I'*) de señales dependiendo de los equivalentes de Pb(II) añadidos. Por ejemplo, la coordinación del 2° eq de Pb(II) a Zn₃- β MT2 mostró las bandas de *tipo I* o una variación de ésta (257, 332, 375 nm).

En los espectros de dif. UV-vis de la preparación Zn-MT3 frente a Pb(II) se observan preferentemente las absorciones de *tipo II*, al igual que en el UV-vis (Tabla 50), y no aparecen las de *tipo I*, pero sí una variación de éstas a 250, 340 y 380 nm (asignadas como √').

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
5	55	4.5	√'	x	x	σ	σ	σ	σ	-	-
10	25	4.5	x	x	x'	σ	√'	√'	√'	√'	-
10	55	4.5	x	x	x'	σ	σ	σ	σ	σ	-
20	55	4.5	x	x	x	x	σ	σ	σ	σ'	σ'
10	25	7.0	x	x'	x'	x'	√'	√'	√'	-	-
10	37	7.0	x	x	x	x	x	x	σ	σ	σ
10	55	7.0	x	x'	x'	x'	x'	σ	σ	σ	σ'
20	37	7.0	x	x	x	x	x	x	x	x	x'
5	37	7.0	x'	x	x	x'	x	x	x	x	σ'

Tabla 50. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en las valoraciones de Zn-MT3 a diferentes condiciones experimentales. Las bandas de *tipo I*: 250, 330, 375 y 400 nm se representan con el símbolo √ y las de *tipo II*, 260 y 350 nm con una x y otras a 270, 315 y 390 nm como σ y como σ' 260, 310 y 390 nm. Y variaciones de las absorciones de *tipo I* como √' (muestran una a 330 nm)

5. Comparación del comportamiento de las diferentes MTs estudiadas frente a Pb(II). Discusión sobre el entorno de coordinación de este ión y su correlación con el carácter de Zn- o Cu-tioneína de cada MT y con los datos bibliográficos

Así también otras absorciones entre 250-270, 315 y 390 nm (como σ) y otras a 317 y 390 nm aprox. (como σ'). En las condiciones de pH neutro se pudo observar que mayoritariamente se mantienen las mismas absorciones antes de la saturación de las señales del UV-vis (marcada en rojo), en cambio a pH 4.5 antes de la saturación ya se observa más de un tipo de señales.

En relación a los dominios de Zn-MT3, sólo Zn₄- α MT3 muestra una mayor diferencia en las absorciones observadas en los espectros de UV-vis. Los espectros de dif. UV-vis muestran que la incorporación de Pb(II) provoca absorciones de ambos tipos (*I* y *II*), pero más bien variaciones de éstas, dependiendo de cada equivalente de plomo añadido. A pH 4.5 se observa que la coordinación del 1° eq de Pb(II) a Zn₄- α MT3 presenta absorciones similares a las de *tipo I* a 250, 330 y 375 nm, mientras que los siguientes iones Pb(II) adicionados muestran las de *tipo II*. En cambio a pH 7.0, la adición del 1° eq de Pb(II) mostró las bandas de *tipo II* y luego una variación de *tipo II* a 250, 340 y 380 (débil) nm (asignada como x'). Y una vez saturado este dominio (a partir del 6° eq de Pb(II) aparecen unas nuevas absorciones a 290 y 400 nm.

En cambio, en Zn₃- β MT3 se observó que la adición de los iones Pb(II) provocó la aparición de absorciones de *tipo II*, desde el 1° hasta el 4° eq de Pb(II), en condiciones de temperatura ambiente a pH 4.5 y 7.0. Mientras que en condiciones de 37 °C a pH 7.0 se observó una variación de estas absorciones.

Por otra parte, cabe recordar que en Zn₇-MT4 (Tabla 51) la coordinación de Pb(II) sólo se da a pH 4.5. A este pH los espectros de dif. UV-vis muestran la aparición de dos tipos de absorciones: las de *tipo I*, desde el 1° hasta el 4° eq de Pb(II) añadido, como las observadas en Zn₇-MT1 en presencia de Pb(II), y una variación de las de *tipo II*, a partir del 5° hasta el 7° eq de Pb(II) añadido.

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μ M	°C	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
10	25-37-55	4.5	√	√	√	√	x'	x'	x	-	-
10	37	7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	55	7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 51. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en las valoraciones de Zn₇-MT4 a diferentes condiciones experimentales. Las bandas de *tipo I*: 250, 330, 375 y 400 nm se representan con el símbolo √ y las de *tipo II*, 260 y 335 nm con una x. Y una variación x'.

Por último, los espectros de dif. UV-vis de Zn-Cup1 en presencia de Pb(II) muestran absorciones de *tipo II* reflejadas en el UV-vis, revelando el mismo comportamiento de coordinación de este ión a lo largo de la valoración, pudiendo indicar un sólo modo de coordinación del ión Pb(II) en la proteína.

Una vez presentadas las absorciones de los espectros de dif. UV-vis que aparecen por la coordinación de Pb(II) a cada una de las MTs estudiadas, se puede indicar que las señales asignadas *tipo I* y *II* se presentan tanto a pH 4.5 como a 7.0. Pero se observaron variaciones dependiendo de las MTs estudiadas y de algunas condiciones experimentales como el pH y la temperatura. Las absorciones observadas en los espectros de dif. UV-vis de las proteínas Zn-MT frente a Pb(II) se muestran en el Anexo 3.

Comparando el conjunto de absorciones observadas en los espectros de dif. UV-vis se puede destacar el hecho de que únicamente se observan las bandas de *tipo I* a lo largo de la valoración con Pb(II) de Zn₇-MT1 y Zn₇-MT2 a pH 4.5. El resto de las valoraciones registradas de las otras MTs muestran mezclas de *tipo I* y *II* o sólo de *tipo II*.

También se puede resaltar que las proteínas que dan lugar a absorciones sólo de *tipo II* a lo largo de toda la valoración con Pb(II) son los dominios Zn₄- α MT y Zn₃- β MT y Zn-Cup1, con un contenido entre 9 y 12 Cys. Este análisis se puede visualizar en el siguiente esquema (Tabla 52):

pH	Tipo de absorción			
	I	I-II	I'-II	II
4.5	MT1, MT2	MT4	MT3	Cup1
		α MT1	α MT3	
		β MT1		β MT3
7.0		MT1, MT2	MT3	Cup1
		β MT1, β MT2	α MT3	α MT1, α MT2 β MT3

Tabla 52. Tipos de absorción, sea *I*, *II* o mezcla, que se observan en los espectros de dif. UV-vis de las MTs estudiadas frente a Pb(II) en condiciones de pH 4.5 y 7.0.

Como se puede observar en la Tabla 52, los diferentes tipos de absorciones encontrados a lo largo de las valoraciones de las MTs frente a Pb(II) revelan la complejidad de la formación de los clústeres Pb-MT, y estos datos indican que la coordinación de los iones Pb(II) a las metalotioneínas puede darse de diferentes formas, una compleja (*tipo I*) y/o una más sencilla (*tipo II*), dependiendo de la proteína y a su vez de las condiciones experimentales, así como también en algunos casos de qué cantidad de Pb(II) acaba coordinándose.

5.1.2. Datos de ESI-MS

El estudio por espectrometría de masas del comportamiento de cada una de las MTs de mamífero estudiadas en presencia de Pb(II) nos muestra las especies formadas al añadir Pb(II) a las soluciones correspondientes. Como ya se ha dicho anteriormente, las especies Pb-MT observadas por ESI-MS experimentan una evolución con el tiempo que no se había observado con otros iones metálicos.⁴² Debido a limitaciones técnicas, estos experimentos se realizaron a 25 y a 37 °C, añadiendo diferentes cantidades de Pb(II) al inicio y observando su evolución a lo largo de varias horas, como ya se explicó en el apartado 2, donde se muestran los resultados que aquí se comparan y más adelante se discuten.

Los espectros de masas de las soluciones Zn-MT de mamífero tras la adición de 7 eq de Pb(II) muestran diferentes comportamientos para cada una de estas proteínas, ya sea en la formación de las especies Pb-MT, algunas sólo homo- y/o heterometálicas de Pb(II) y también en la estabilidad de las especies iniciales Zn-MT, y como evolucionan respecto al tiempo. La siguiente tabla resume el comportamiento de cada una de estas MTs frente a Pb(II):

MTs	Tiempo de reacción	Especie inicial	Naturaleza homo-/heterometálica de las especies en solución	Especiación	Especie más abundante
MT1	10'- 1 h	Zn ₇	Heterometálicas Pb,Zn	Pb ₁ Zn ₆ hasta Pb ₁₀	Zn ₇
	2-4 h	Disminuye Zn ₇	Heterometálicas, Pb,Zn	Pb ₁ Zn ₆ hasta Pb ₁₀	Pb ₉ Pb ₄ Zn ₄ (4 h)
	6-24 h	-----	Homometálicas Pb(II)	Pb ₄ Zn ₄ hasta Pb ₁₀	Pb ₉
MT2	10'	Zn ₇	Heterometálicas Pb,Zn	Pb ₁ Zn ₇ hasta Pb ₉	Pb ₇ Zn ₁
	1-4 h	-----	Homometálicas Pb(II)	Pb ₄ Zn ₄ hasta Pb ₁₀	Pb ₉
	6-24 h	Zn ₇	Heterometálicas Pb,Zn	Pb ₁ Zn ₇ hasta Pb ₁₀	Pb ₉
MT3	10'-2 h	-----	Homometálicas Pb(II)	Pb ₆ Zn ₁ hasta Pb ₁₀	Pb ₉
	4 h	-----	Heterometálicas Pb,Zn	Pb ₃ Zn ₄ hasta Pb ₁₀	Pb ₈ Zn ₁
	8-24 h	Zn ₇	Heterometálicas Pb,Zn	Pb ₁ Zn ₆ hasta Pb ₈ Zn ₁	Pb ₅ Zn ₃ y Pb ₆ Zn ₁

Tabla 53. Características de la evolución de las especies formadas en las MTs frente a Pb(II) observadas en los espectros de masas, cuando se adicionan 7 eq de Pb(II) en soluciones 10 µM de Zn-MT a pH 7.0 y 25 °C.

Tras la adición de 7 eq de Pb(II) a MT1 se observó en un inicio (10') que la especie de partida Zn₇-MT1 se mantiene como la más abundante y sólo aparecen especies minoritarias de Pb-MT1, tanto homo- como heterometálicas Pb,Zn-MT1 (desde Pb₁Zn₅- hasta Pb₁₀-MT1); en cambio para MT2, el clúster inicial Zn₇-MT2 no es la mayoritaria y se forman especies de Pb(II) que son más abundantes (desde Pb₁Zn₇- hasta Pb₉-MT2), siendo el pico más intenso el de la especie Pb₇Zn₁-MT2. Por su parte, en la proteína más singular MT3, las especies de Zn iniciales son casi nulas y los picos más intensos

corresponden a la formación de las especies de Pb(II) (desde Pb_6Zn_1 - hasta Pb_{10} -MT3), siendo Pb_9 -MT3 el clúster más abundante. Para MT4, se observó que no forma especies de Pb(II) y mantiene su especie inicial Zn_7 -MT4 como la más abundante.

Cada una de las MTs enteras sigue una evolución diferente de las especies que forman (Tabla 53), pero como se pudo observar en sus espectros de masas las tres isoformas forman clústeres con similar contenido de iones Pb(II), así como la cantidad total de iones, ya sean homo- u heterometálicos, está entre 7 y 10 metales. Así también, se pudo observar que en MT1 y MT2 la especie más abundante es Pb_9 -MT, mientras que en MT3 ésta sólo es mayoritaria en un comienzo y finalmente las especies más abundantes son las heterometálicas Pb_6Zn_1 - y Pb_5Zn_3 -MT3.

En los experimentos con exceso de Pb(II) al añadir 35 equivalentes a las soluciones Zn-MT de mamífero se observó una mayor estabilidad de las especies formadas, tal como se muestra resumido en la Tabla 54.

MTs	Tiempo de reacción	Especie inicial	Naturaleza homo-/heterometálica de las especies en solución	Especiación	Especie más abundante
MT1	10'-24 h	----	Homometálicas Pb(II)	Pb_7 hasta Pb_{10}	Pb_9 y Pb_{10} (6-24h)
MT2	10'	casi nula Zn_7	heterometálicas Pb,Zn	Pb_4Zn_4 hasta Pb_{10}	Pb_9
	1-24 h	-----	homometálicas Pb(II)	Pb_7Zn_1 hasta Pb_{10}	Pb_9
MT3	10'-2 h	-----	homometálicas Pb(II)	Pb_6Zn_1 hasta Pb_{11}	Pb_{10}
	4 h	-----	heterometálicas Pb,Zn	Pb_4Zn_4 hasta Pb_{11}	Pb_9
	8-24 h	Zn_7	heterometálicas Pb,Zn	Pb_1Zn_6 hasta Pb_{11}	Pb_9 , Pb_{10} , Pb_8Zn_1 y Pb_9Zn_1

Tabla 54. Características de la evolución de las especies formadas en las MTs frente a Pb(II) observadas en los espectros de masas, cuando se adiciona un exceso de 35 eq de Pb(II) en soluciones 10 μ M de proteína a pH 7.0 y 25 °C.

En los espectros de masas registrados para las tres MTs, la especie inicial Zn_7 -MT desaparece (24 horas para Zn -MT1 y -MT2) por efecto del exceso de Pb(II), pero en Zn -MT3 ésta vuelve a formarse a partir de las 8 h. En el caso Zn_7 -MT1 se forman especies mayoritariamente homometálicas de Pb(II), siendo la más abundante en un comienzo Pb_9 -MT1 hasta las 4 horas y finalmente Pb_{10} -MT1. Mientras que en Zn_7 -MT2 en un comienzo se forman más variedad de especies heterometálicas, pero la especie Pb_9 -MT2 es la más abundante, al igual que en MT1. En ambas proteínas, el pico de la especie Pb_{10} -MT se hace más abundante a medida que avanza el tiempo. Así también, en la preparación Zn -MT3 se forman especies homometálicas (Pb_7 - hasta Pb_{11} -MT3), siendo la más abundante Pb_{10} - seguida de Pb_9 -MT3. Pero se observa un cambio en la

5. Comparación del comportamiento de las diferentes MTs estudiadas frente a Pb(II). Discusión sobre el entorno de coordinación de este ión y su correlación con el carácter de Zn- o Cu-tioneína de cada MT y con los datos bibliográficos

evolución de las especies, apareciendo picos de especies heterometálicas, que se hacen más intensos con el tiempo. A las 24 horas las especies más abundantes son Pb_9^- , Pb_{10}^- , $Pb_8Zn_1^-$ y $Pb_9Zn_1^-$ -MT3.

En otro experimento por masas, al añadir 10 eq de Pb(II) a las soluciones Zn-MT en condiciones similares a las fisiológicas se pudo observar que cada MT tiene un comportamiento diferente en presencia de Pb(II), tal como se describió en el apartado 4. Los espectros de masas muestran una evolución diferente a la observada en las anteriores condiciones, como se puede observar en la Tabla 55.

MTs	Tiempo de reacción	Especie inicial	Naturaleza homometálica/heterometálica de las especies en solución	Especiación	Especie más abundante
MT1	10'	----	Homometálicas Pb(II)	Pb_6Zn_2 hasta Pb_{10}	Pb_8
	1-8 h	Zn_7	Heterometálicas Pb,Zn	Pb_1Zn_6 hasta Pb_{10}	Zn_7 y Pb_8Zn_1 (sólo a 1h)
MT2	10'	Zn_7	heterometálicas Pb,Zn	Pb_1Zn_6 hasta Pb_{10}	Pb_7Zn_1 y Pb_9
	1-2 h	Zn_7	homometálicas Pb(II)	Pb_7Zn_1 hasta Pb_{10}	Pb_8Zn_1 , Pb_9 y Pb_{10}
	3-8 h	Zn_7	Heterometálicas Pb,Zn	Pb_4Zn_4 hasta Pb_{10}	Pb_9 y Pb_7Zn_1 (8h)
MT3	10'-2 h	Zn_7	heterometálicas Pb,Zn	Pb_1Zn_6 hasta Pb_{10}	Pb_6Zn_2 , Pb_8Zn_1
	3-5 h	-----	heterometálicas Pb,Zn	Pb_1Zn_6 hasta Pb_{10}	Pb_8Zn_1
	8-24 h	Zn_7	heterometálicas Pb,Zn	Pb_1Zn_6 hasta Pb_{10}	Pb_8Zn_1 , Pb_9 , Pb_{10}

Tabla 55. Características de la evolución de las especies formadas en las MTs frente a Pb(II) observadas en los espectros de masas, cuando se adiciona un exceso de 10 eq de Pb(II) en soluciones 10 μ M de proteína a pH 7.0 y 37 °C.

En estos experimentos en un comienzo se observó que la adición de 10 eq de Pb(II) a las MTs de mamífero no provocó que la especie Zn-MT inicial desapareciera, con excepción de MT1, pero al cabo de 1 hora vuelve a formarse y se mantiene como la más abundante en el tiempo, pero en cambio para MT2 y MT3 sí se mantiene, aunque no es la más abundante (50% aprox.). Al cabo de 24 horas el clúster Zn_7 -MT3 aparece con una abundancia mínima.

Además las especies formadas son mayoritariamente heterometálicas, desde Pb_1Zn_6 - hasta Pb_{10} -MT. Y al final de la reacción se observaron como especies más abundantes en MT2 y MT3 las heterometálicas: $Pb_7Zn_1^-$ y $Pb_8Zn_1^-$, respectivamente, y las homometálicas Pb_9^- (en ambas) y Pb_{10} -MT3.

Siguiendo con el análisis del estudio por espectrometría de masas de los dominios Zn_4 - α MT y Zn_3 - β MT de MT1, MT2 y MT3, llevados a cabo en condiciones con y sin

exceso de Pb(II) a pH 7.0 y 25 °C, los espectros registrados mostraron que cuando se adicionan 4 eq de Pb(II) a los dominios Zn₄- α MT se observó que el clúster inicial de Zn(II) se mantiene como el más abundante en α MT1 y en α MT2 hasta las 8 horas. Pero en α MT3 a partir de las 6 horas esta especie desaparece y se forma la apo- α MT. En α MT1 además se forman especies de Pb(II) de mínima abundancia (Pb₁Zn₃- hasta Pb₅- α MT1). En cambio en α MT2 se formaron especies de mayor abundancia como Pb₆- y Pb₅- α MT2. Por su parte, en α MT3 forma especies homo y heterometálicas de Zn(II) como Zn₁- y Pb₂Zn₁- α MT3.

Por otro lado, cuando se adiciona un exceso de 16 eq de Pb(II) a los dominios Zn₄- α MT, se observó que α MT1 tienen un comportamiento similar al descrito anteriormente. Mientras que en α MT2 no se observó la especie inicial Zn₄- α MT2 y se forman especies homometálicas de Pb(II) abundantes como son Pb₅- y Pb₆- α MT2. En α MT3 en un comienzo se forman especies Pb₅- y Pb₆- α MT3 que después desaparecen y luego aumentan su abundancia otras especies con menos iones Pb(II) (Pb₁ hasta Pb₄), y el clúster Zn₁- α MT3 es el más abundante y además aparece la apo- α MT3.

Por otro parte, en el estudio de los dominios Zn₃- β MT al añadir 3 eq de Pb(II) los espectros de masas registrados muestran que en las tres proteínas la especie inicial Zn₃- β MT está presente, además de otras especies que se forman tanto homo como heterometálicas de Pb(II). En β MT1 y β MT2 el clúster más abundante es Pb₄- y aparece hasta la especie Pb₅- β MT1/2. En cambio para β MT3 en un comienzo la especie más importante es Pb₁Zn₁- β MT3 (hasta las 2 horas) y luego el pico de Zn₁- β MT3 es el más intenso, además está presente la apo- β MT3.

En los experimentos de Zn₃- β MT en presencia de un exceso de 12 eq de Pb(II), los espectros de masas mostraron que en β MT1 y β MT2 el clúster inicial (Zn₃-) desaparece y la especie más abundante es Pb₄- β MT1/2. En cambio para β MT3 se forman varias especies homo y heterometálicas de Pb(II), además de la apo- β MT3, siendo en un inicio la más abundante Pb₃- β MT3 y finalmente son Pb₁Zn₁- y Zn₁- β MT3.

En todos estos experimentos se pudo observar que el exceso de iones Pb(II) tiene un efecto en la desaparición de los clústeres iniciales de Zn(II) y además en la formación de especies homometálicas de Pb(II) con mayor abundancia, ya que al haber más iones plomo en solución favorece la reacción de incorporación de éstos por los de Zn(II) dentro de la proteína. Además este comportamiento es más notable en aquellas MTs que tienen un carácter menos cercano a una Zn-tioneína.

5.1.3. Datos de ITC

El estudio por microcalorimetría ITC de la habilidad coordinante de las diferentes MTs estudiadas frente a Pb(II) nos proporciona datos termodinámicos referentes al desplazamiento de Zn(II) por Pb(II) al valorar las proteínas Zn-MT con Pb(ClO₄)₂. Como se ha indicado anteriormente las MTs estudiadas por ITC son: las de mamífero Zn₇-MT1 y sus dominios α y β MT1, Zn₇-MT2, Zn-MT3 y sus dominios α y β MT3, Zn₇-MT4; y la MT de levadura Zn-Cup1. Debido a razones técnicas, básicamente por la baja solubilidad del catión Pb(II) a pH superiores a 4.5, los experimentos se realizaron todos a pH 4.5. Los resultados obtenidos en las correspondientes valoraciones se resumen a continuación en la Tabla 56.

Zn-MT	K (10 ⁵)	Log K	T (K)	ΔG (cal/mol)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/molK)	Nº eq Pb(II)
MT1	9.0 ± 0.78	5.95	328	-8930	-5545 ± 43	10.3	8.50 ± 0.04
α MT1	5.09 ± 0.786	5.71	298	-7776	-6083 ± 88	5.76	6.38 ± 0.06
β MT1	2.43 ± 0.178	5.39	298	-7339	-8986 ± 148	-5.41	2.02 ± 0.02
MT2	5.89 ± 1.29	5.77	310	-8179	-5136 ± 122	9.84	13.3 ± 0.17
MT3	4.23 ± 0.35	5.66	298	-7667	-8709 ± 105	-3.41	5.64 ± 0.05
α MT3	5.11 ± 0.58	5.71	298	-7779	-7249 ± 98	1.85	3.44 ± 0.03
β MT3	3.44 ± 0.180	5.54	298	-7544	-8815 ± 64	-4.16	3.53 ± 0.02
MT4	2.44 ± 0.51	5.39	310	-7637	-5713 ± 168	6.21	10.7 ± 0.22
Cup1	3.15 ± 0.39	5.50	318	-7995	-7731 ± 201	0.86	3.96 ± 0.07

Tabla 56. Datos termodinámicos obtenidos a partir de los experimentos de ITC de la valoración con Pb(II) de las MTs de mamífero y sus dominios (con excepción de α - y β MT2) a concentraciones estándar, a pH 4.5 y a las temperaturas indicadas. El resultado de ΔG se ha obtenido a partir de la fórmula $\Delta G = -RT \ln K$.

En un primer análisis de los datos termodinámicos obtenidos de las valoraciones con Pb(II) de cada una de las MTs, se puede observar que todos los procesos de intercambio de Zn(II) por Pb(II) son espontáneos ($\Delta G < 0$) y exotérmicos ($\Delta H < 0$). Las proteínas se pueden ordenar según el valor de ΔH en la siguiente secuencia:

$$\Delta H: \text{MT2} > \text{MT1} > \text{MT4} \gg \alpha\text{MT1} > \alpha\text{MT3} > \text{Cup1} > \text{MT3} > \beta\text{MT3} > \beta\text{MT1}$$

De acuerdo a los valores de entropía (ΔS) mostrados en la Tabla 56, se puede proponer que la formación de los nuevos clústeres Pb-MT tienen un distinto grado de orden para cada MT. El $\Delta S > 0$ nos revela un mayor grado de desorden de los complejos Pb-MT, como sucede en Zn-MT1, Zn- α MT1, Zn-MT2, Zn- α MT3, Zn-MT4 y Zn-Cup1 que tienen más de un proceso de incorporación de los iones Pb(II) con sitios de unión diferentes, tal como se puede ver en la Fig. 220.

En cambio, cuando $\Delta S < 0$ es indicativo de que los clústeres formados son más estructurados que los iniciales, esto se ve claramente en la valoración de Zn-MT3, Zn- β MT3 y Zn- β MT1 (Fig. 221), en las que además sucede que todos los sitios de unión de Pb(II) parecen equivalentes (como se explicó anteriormente, esto sucede cuando la curva experimental coincide con la teórica ajustada a un único sitio de unión).

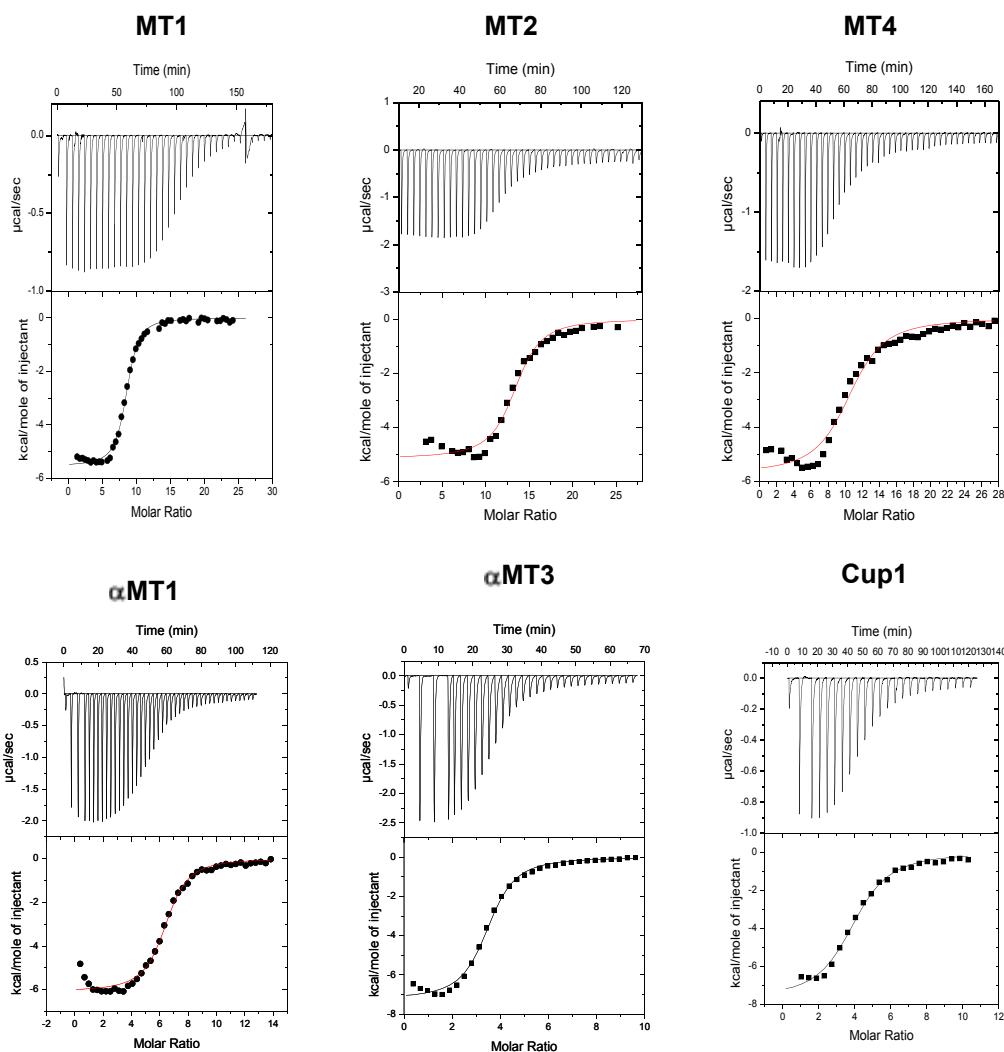


Figura 220. Termogramas correspondientes a las valoraciones de Zn-MT1, -MT2, -MT4, los dominios Zn- α MT1 y - α MT3 y Zn-Cup1, con $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$ a pH 4.5 y a las temperaturas indicadas en la Tabla 56. Las curvas experimentales han sido ajustadas a las correspondientes curvas teóricas considerando un único sitio de unión “one binding site”.

Al comparar los valores de entropía (ΔS) se tiene una relación del grado de orden de los agregados Pb-MT formados, de más desorden a más orden se tiene la siguiente secuencia:

$$\Delta S: \text{MT1} > \text{MT2} > \text{MT4} > \alpha\text{MT1} > \alpha\text{MT3} > \text{Cup1} \gg \gg \text{MT3} > \beta\text{MT3} > \beta\text{MT1}$$

5. Comparación del comportamiento de las diferentes MTs estudiadas frente a Pb(II). Discusión sobre el entorno de coordinación de este ión y su correlación con el carácter de Zn- o Cu-tioneína de cada MT y con los datos bibliográficos

En cuanto a la habilidad coordinante que tienen estas MTs frente a Pb(II) se puede mostrar que las especies Pb-MT formadas en cada una de las proteínas siguen el siguiente orden según la cantidad de cisteínas:

$$N^{\circ}_{20 \text{ Cys}}: \text{Pb}_{13}\text{-MT2} > \text{Pb}_{11}\text{-MT4} > \text{Pb}_9\text{-MT1} > \text{Pb}_6\text{-MT3}$$

$$N^{\circ}_{11 \text{ Cys}}: \text{Pb}_6\text{-}\alpha\text{MT1} > \text{Pb}_4\text{-Cup1} > \text{Pb}_3\text{-}\alpha\text{MT3} = \text{Pb}_4\text{-}\alpha\text{MT3}$$

$$N^{\circ}_{9 \text{ Cys}}: \text{Pb}_4\text{-}\beta\text{MT3} > \text{Pb}_2\text{-}\beta\text{MT1}$$

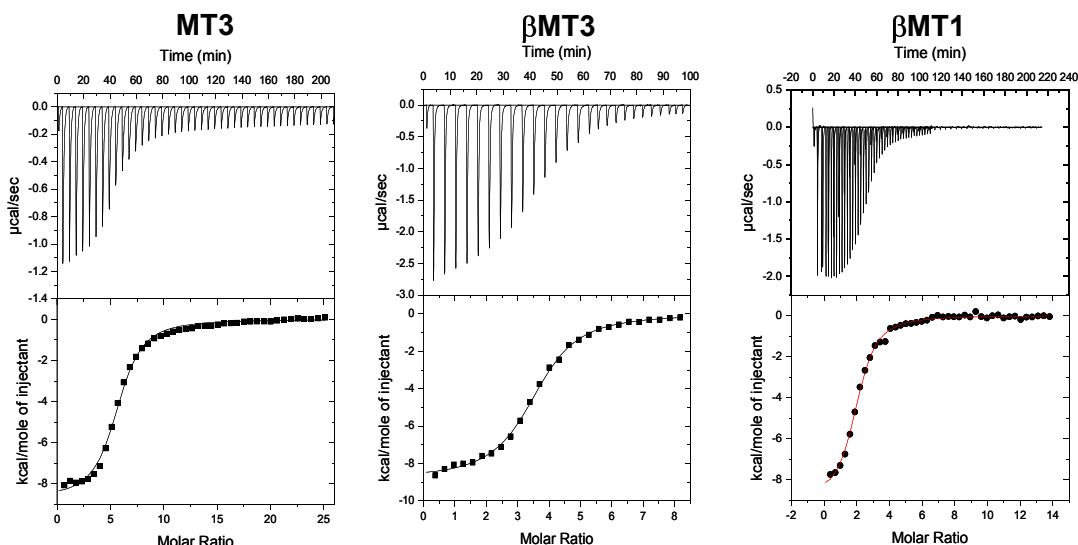


Figura 221. Termogramas correspondientes a las valoraciones de Zn-MT3, Zn- β MT3 y Zn- β MT1, con Pb (ClO₄)₂ a pH 4.5 y a las temperaturas indicadas en la Tabla 56. Las curvas experimentales han sido ajustadas a las correspondientes curvas teóricas considerando un único sitio de unión “one binding site”.

Con los datos obtenidos se puede hacer una relación entre el número de cisteínas de cada MT y el número de equivalencia de Pb(II) para así calcular cuántas Cys podrían participar en la coordinación de cada ión Pb(II), partiendo del supuesto que los iones Pb(II) es tan co ordenados sólo por azufres cisteínicos. El número de ligandos de cisteínas coordinados al ión Pb(II) lo asignaremos como L (los valores se recogen en la Tabla 57), siendo:

$$L = N^{\circ} \text{ Cys} / N^{\circ} \text{ de eq Pb(II)}$$

En la siguiente gráfica de ΔH vs. L (Fig. 222) se puede ver que mientras L es menor a 2 Cys la diferencia de entalpía está entre -5000 y -6000 calorías, en cambio a valores de L aproximados a 3 Cys por eq de Pb(II), la reacción es más exotérmica obteniéndose diferencias de entalpía sobre las -7000 calorías. También se puede observar que tres de las proteínas, β MT1, MT3 y β MT3, que dan lugar a los procesos más exotérmicos, son aquellas que muestran todos los sitios de unión de Pb(II) equivalentes.

Zn-MT	N° Cys	N° eq de Pb(II)	L=N° Cys/N° eq de Pb(II)	$\Delta H(\text{cal/mol})$
MT1	20	8.50	2.4	-5552
α MT1	11	6.38	1.7	-6083
β MT1	9	2.02	4.5	-8986
MT2	20	13.3	1.5	-5130
MT3	20	5.64	3.5	-8709
α MT3	11	3.44	3.2	-7249
β MT3	9	3.53	2.6	-8815
MT4	20	10.7	1.9	-5713
Cup1	12	3.96	3.0	-7723

Tabla 57. Relación entre el número de Cys presentes en la proteínas analizadas, el número de equivalentes de Pb(II) en el punto de saturación (N, calculados a partir de los datos de ITC) y el valor de entalpia calculados a partir la valoraciones con Pb(II) de las diferentes proteínas analizadas a pH 4.5 y 25 °C.

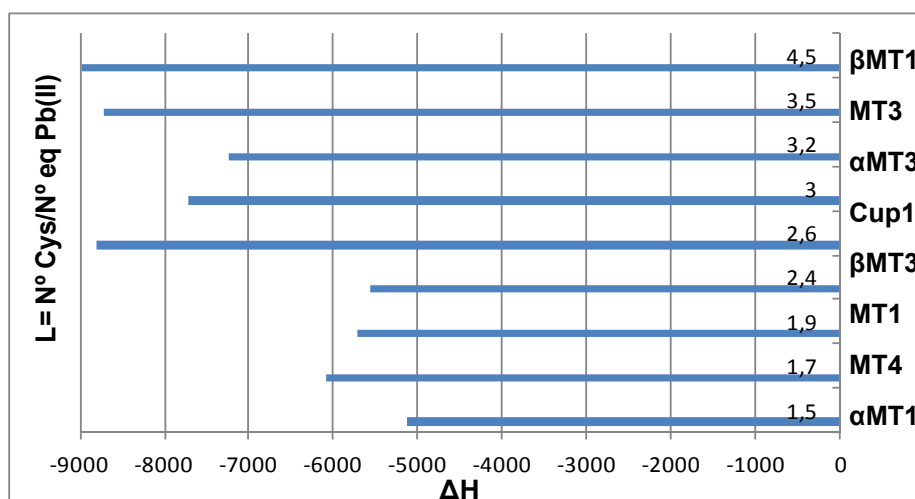


Figura 222. Gráfica que muestra la relación entre los valores de ΔH calculados por ITC al valorar las correspondientes Zn-MTs con Pb(II) y el parámetro. L (N° Cys/punto saturación Pb).

Como las valoraciones seguidas por calorimetría se realizaron cada una a una temperatura diferente, para poder comparar los valores de las constantes de afinidad (K) y de las energías de Gibbs (ΔG) se realizó el cálculo de dichos parámetros termodinámicos a 25 °C mediante la ecuación de van't Hoff.³⁵⁰

5. Comparación del comportamiento de las diferentes MTs estudiadas frente a Pb(II). Discusión sobre el entorno de coordinación de este ión y su correlación con el carácter de Zn- o Cu-tioneína de cada MT y con los datos bibliográficos

Los datos calculados se muestran en la siguiente tabla:

Zn-MT	K	$\Delta G(\text{cal/mol})$
MT1	21.2×10^5	-8621
α MT1	5.09×10^5	-7776
β MT1	2.43×10^5	-7339
MT2	8.24×10^5	-8062
MT3	4.23×10^5	-7667
α MT3	5.11×10^5	-7779
β MT3	3.44×10^5	-7544
MT4	3.55×10^5	-7564
Cup1	7.16×10^5	-7979

Tabla 58. Datos termodinámicos (K y ΔG) a 25 °C calculados a partir de los experimentos de ITC de la valoraciones con Pb(II) de las MTs de mamífero y sus dominios (con excepción de α - y β MT2) a concentraciones estándar, a pH 4.5 y utilizando la ecuación de Van't Hoff.

A partir de estos valores de K presentes en la Tabla 58, se pueden establecer el siguiente orden:

$$\mathbf{K: MT1 \gg\gg MT2 > Cup1 > \alpha MT3 \sim \alpha MT1 > MT3 > MT4 > \beta MT3 > \beta MT1}$$

Teniendo en cuenta los valores obtenidos y la gradación, se puede decir que MT1 presenta un valor de K muy superior al de las otras MTs, mientras que MT3 y MT4 tiene valores mu y si milares. En relación a los dominios aislados de estas MTs, se puede observar que α MT3 y α MT1, tienen valores de K muy similares entre sí, y presentan una mayor afinidad por Pb(II) que β MT3 y β MT1.

Por su parte, la MT de levadura Cup1 muestra inesperadamente (si se tiene en cuenta su menor número de Cys en comparación con las MT de mamífero) una gran afinidad por el ión Pb(II), con un valor de K cercano al de MT2.

Evidentemente, la relación existente entre la energía de Gibbs y la constante asociada al proceso, hace que las relaciones observadas con los valores de K sean perfectamente extrapolables si se consideran los valores de ΔG asociados al proceso en estudio. Así, MT1 es la MT de mamífero que tiene una reacción más espontánea y por otro lado, MT4 es la que muestra un proceso menos favorable. Pero es importante destacar que todos los valores son muy cercanos (entre -7.3 y -8.6 kcal), demostrando que en todos los casos la coordinación de Pb(II) a las diversas MTs estudiadas sigue un proceso termodinámicamente espontáneo.

En relación a los datos termodinámicos de MT2, éstos no coinciden con los reportados en la literatura,³³⁷ pero sí la K es del mismo orden. Esto puede deberse a que las condiciones de trabajo son diferentes, ya que en este estudio se utilizó un pH

4.7 y además un tampón de acetato de sodio (que podría participar en la coordinación de Pb(II)).

5.2. Correlación entre el comportamiento de las MTs estudiadas frente a Pb(II), su carácter Zn- o Cu-tioneína y los datos bibliográficos

5.2.1. Comparación de las absorciones observadas por dif. UV-vis con los datos bibliográficos reportados sobre la coordinación de Pb(II) a proteínas de zinc

Como ya se indicó en la introducción, existen muy pocos trabajos que correlacionen la geometría de coordinación del ión Pb(II) con las señales espectroscópicas. Entre los pocos que sí hacen referencia a esta relación se encuentran los estudios de interacción de Pb(II) con proteínas de zinc y péptidos.^{243,285,286,310} En éstos se pone de manifiesto que el ión Pb(II) prefiere coordinarse por medio de tres cisteínas con una geometría piramidal trigonal, aún habiendo otras Cys o His disponibles. Este tipo de coordinación, correspondiente a especies Pb-S₃, provoca la aparición de dos absorciones: una ancha a 250-260 nm, y otra menor a 330-360 nm, dando lugar a un espectro UV-vis característico (Fig. 223 y Tabla 59). Estas bandas se ven influenciadas por la temperatura, resultando en un leve desplazamiento de los máximos hacia el azul al disminuir la temperatura.

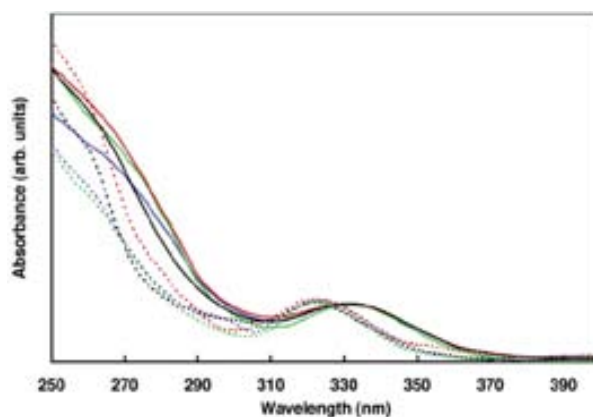


Figura 223. Espectros de UV-vis de Pb-péptidos registrados a diferentes temperaturas, (T^a ambiente líneas sólidas y baja temperatura líneas de guiones): Pb-CP-CCCC (azul), Pb-CP-CCCH (verde), Pb-CP-CCHC (rojo), Pb-HIV-CCHC (negro), característico de la coordinación Pb-S₃ con geometría piramidal trigonal.²⁸⁶

Relacionando estos datos bibliográficos con los resultados obtenidos en esta Tesis, se observó la gran similitud entre las bandas reportadas y las asignadas como *tipo II* cuando el Pb(II) se coordina a algunas metalotioneínas. Este hecho es indicativo de que uno de los modos de coordinación del ión Pb(II) en las MTs estudiadas (que da lugar a

5. Comparación del comportamiento de las diferentes MTs estudiadas frente a Pb(II). Discusión sobre el entorno de coordinación de este ión y su correlación con el carácter de Zn- o Cu-tioneína de cada MT y con los datos bibliográficos

absorciones de *tipo II*) implica la participación de tres Cys para formar un complejo Pb-S₃ con una geometría piramidal trigonal.

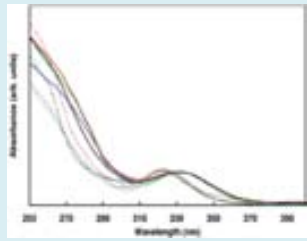
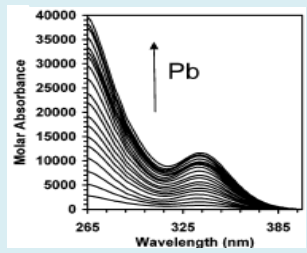
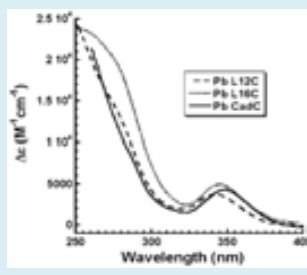
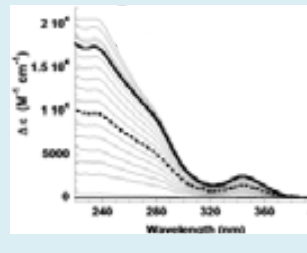
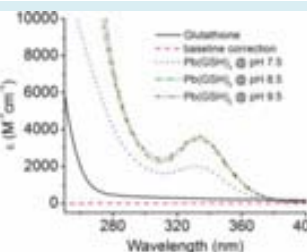
Pb-proteína	Abs. (nm) UV-vis	Espectro UV-vis
Pb-dedos Zn Pb-CPCCCC Pb-CP-CCHC Pb-CP-CCCH Pb-HIV-CCHC	255;330(298K) 255-260(4K) 320-325	 a
Pb-GATA	263;336 (DF)	 b
Pb-CadC	278;346	 c
Pb-(TRI-L9CL19C) ₃ ⁻	240-250; 344	 d
Pb-(GSH) ₃	250;~334	 e

Tabla 59. Conjunto de datos existentes en la bibliografía que relacionan la coordinación de Pb(II) a proteínas de zinc y péptidos con las absorciones de los espectros de UV-vis. **a.** ref. 286 (registrados a diferentes temperaturas), **b** ref. 285 (DF: “double GATA finger”); **c** y **d** ref. 310; **e** ref. 243.

En relación a las otras absorciones observadas (de *tipo I*: 250, 330, 375 y 400 nm) tras la coordinación de Pb(II) a las MTs, es importante destacar que sólo se han observado estas señales para el enlace Pb-MT2 a pH 4.3, pero no existe en la

bibliografía ningún dato que las correlaciones con algún tipo de coordinación y geometría. La ausencia de esta correlación y la complejidad coordinativa del ión Pb(II) dificulta enormemente la asignación de este tipo de absorciones a una geometría.

5.2.2. Comparación de las absorciones observadas por dif. UV-vis con los datos bibliográficos reportados en un estudio teórico

La escasez de datos experimentales que permitan asignar las absorciones de UV-vis con la coordinación de Pb(II) a las MTs a dado lugar a la consideración de un conjunto de resultados utilizando cálculos teóricos, aún teniendo en cuenta las grandes limitaciones de éstas técnicas cuando están implicados metales.

El estudio computacional de Jarzęcki considera un modelo de complejos mononucleares de plomo(II) y modos de tri y tetra-coordinación (ver Fig. 18), y la predicción de sus espectros de UV-vis.²²⁸ Los modelos representan todas las combinaciones de ligandos tiolato e imidazol, imitando la coordinación de la cisteína y la histidina al centro metálico. Las geometrías moleculares computarizadas se compararon con un conjunto de estructuras cristalinas de rayos X y mediciones de EXAFS, tanto de complejos de Pb(II) como de algunas proteínas coordinando Pb(II). Los espectros de UV-vis calculados se compararon con los experimentales del modelo de péptidos de plomo reportados por Godwin²³³ y se corrigieron los datos teóricos para adaptarlos a los experimentales.

En la predicción de los espectros de UV-vis de los diferentes modos de coordinación (Tabla 60 y Fig. 224) se pueden diferenciar las absorciones que aparecen para cada complejo de Pb(II) estudiado, sea tri-coordinado y/o tetra-coordinado, así como las posibles mezclas de especies.

Pb-	Tri-coordinado	Abs. UV-vis (nm)	Tetra-coordinado	Abs. UV-vis (nm)
1 modo de coordinación	[PbS ₃] ⁻	257, 303, 320, 355	[PbS ₄] ²⁻	279, 330, 375
	[PbS ₂ N]	245, 303, 343	[PbS ₃ N]	263, 285, 343
	[PbSN ₂] ⁺	215, 248, 315	[PbS ₂ N ₂]	259, 292
	[PbN ₃] ²⁺	235, 305	[PbSN ₃] ⁻	250, 320
Pb-	Tri-/Tetra-coordinado	Abs. UV-vis (nm)	Tabla 60. Absorciones obtenidas de la predicción de los espectros UV-vis de los modelos de complejos de Pb(II) tri- y tetra-coordinados, y mezcla de estos mismos. ²²⁸	
2 modos de coordinación	[PbS ₃]/[PbS ₄] ²⁻	263, 345		
	[PbS ₂ N]/[PbS ₃ N]	258, 325		
	[PbSN ₂] ⁺ /[PbS ₂ N ₂]	254, 295		

5. Comparación del comportamiento de las diferentes MTs estudiadas frente a Pb(II). Discusión sobre el entorno de coordinación de este ión y su correlación con el carácter de Zn- o Cu-tioneína de cada MT y con los datos bibliográficos

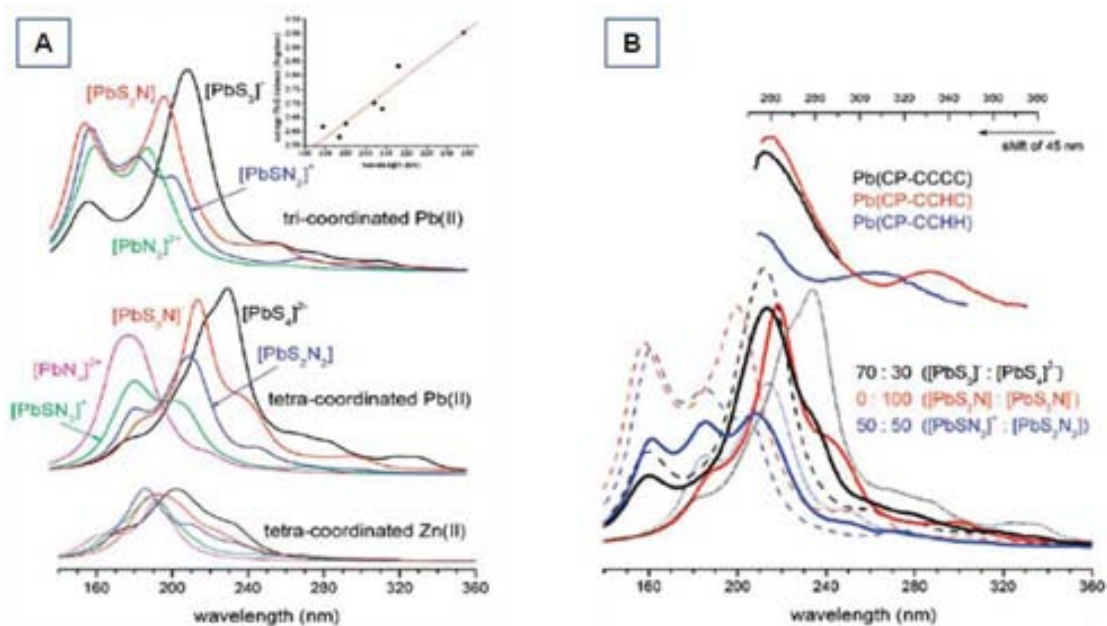


Figura 224. Comparación de los espectros de UV-vis obtenidos a partir del estudio teórico de Jarzęcki: (A) un sólo modo de coordinación de Pb(II) y (B) mezclas de complejos (líneas sólidas, negra, PbS₃/PbS₄; roja, PbS₂N/PbS₃N; azul, PbSN₂/PbS₂N₂).²²⁸

Algunas de las absorciones observadas en los espectros de UV-vis de las MTs estudiadas frente a Pb(II) se pueden identificar en los datos teóricos publicados (Tabla 60). Lo primero que se pudo observar es que el espectro simulado de la especie de Pb-tricoordinado [PbS₃]²⁻ (Fig. 224A) muestra cuatro absorciones: a 255 (100%), 303 (15%), 320 (10%) y 355 (5%) nm (% intensidad relativa) que difieren de lo reportado en los espectros de UV-vis de las proteínas dianas de Pb(II) (banda ancha e intensa a 250-260 (100%) y un hombro a 350 (25%) nm, como las de *tipo II*). Si n embargo, las absorciones de *tipo II* son similares a las calculadas para las mezclas de Pb-S₃ y Pb-S₄ (Fig. 224B), sugiriendo la posibilidad de que en los datos experimentales coexistan una mezcla de especies.

Las señales asignadas en esta Tesis como de *tipo I* se pueden observar en el modo de coordinación de Pb-tetraordinado, [PbS₄]²⁻, que presenta tres bandas a 279, 330, 375 nm, que podría indicarnos la presencia de Pb(II) enlazado por medio de cuatro cisteínas. Aunque el espectro simulado no presenta la absorción a 400 nm, este modelo de coordinación es el único que muestra absorciones análogas a las observadas en las de *tipo I*. Las bandas ausentes podrían ser indicativas de una distorsión en la geometría tetraédrica o la presencia de otros tipos de coordinación no consideradas en este estudio teórico (números de coordinación superiores a 4, otros ligandos dadores como O, etc.).

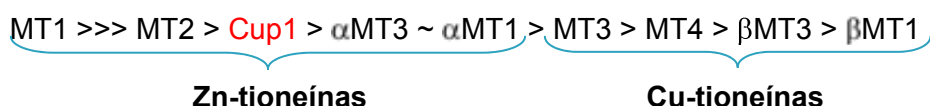
Finalmente, cabe destacar que algunas de las absorciones que se observan en los espectros de dif. UV-vis de algunas metalotioneínas (como por ejemplo, a 315 nm), que no son tan relevantes como las que se reflejan en los espectros de UV-vis, y no se han asignado a ninguno de los dos tipos mayoritarios, se ven reflejadas en la Tabla 60. Éstas absorciones, que no se pueden asignar unívocamente a un sólo tipo de coordinación, son indicativas, una vez más, de la gran complejidad asociada a la coordinación del ión Pb(II) cuando se enlaza a las MTs.

Según nuestro análisis, cuando el Pb(II) se coordina de forma tetraédrica las especies Pb-S₄ necesitan tiempos de estabilización largos para conseguir una mayor estructuración, presentando las absorciones de *tipo I*. Por el contrario, cuando este metal se coordina mostrando absorciones de *tipo II*, según los antecedentes, ya sea de manera tri coordinado (Pb-S₃) o presenta mezclas de tri y tetra coordinación, las especies Pb-MT se estructuran rápidamente con t_{est} cortos. Pudiendo concluir que la coordinación de *tipo I* es más compleja, mientras que la de *tipo II* es más sencilla.

5.2.3. Correlación entre el entorno de coordinación del ión Pb(II) y el carácter de Zn- o Cu-tioneína de las MTs estudiadas frente a Pb(II)

Primero debemos recordar que las MTs de mamífero estudiadas en presencia de Pb(II) ya han sido clasificadas según su carácter de Zn- o Cu-tioneína.^{37,95,96,167} Como se ha descrito anteriormente en la introducción, las que presentan un mayor carácter de Zn-tioneína son MT1 y MT2, además de sus dominios α MT1 y α MT2. Por otra parte, las de mayor carácter de Cu-tioneína son las proteínas MT3, MT4 y la más representativa Cup1 de la vadura, además de los fragmentos β MT1, β MT2, β MT3 y β MT4. Cabe destacar que para clasificar una MT entre Zn- o Cu-tioneína, uno de los parámetros a considerar es la estabilidad de las especies Zn- y Cu-MT, y por consiguiente la facilidad para desplazar o liberar el Zn inicialmente coordinado en presencia de otro metal que presente mayor afinidad, como es el caso de Cd(II) y Pb(II). También sería necesario tener en cuenta que las MT que presentan carácter de Zn-tioneína tendrían una mayor afinidad por los metales divalentes, como es el caso del ión Pb(II).

Teniendo en cuenta el conjunto de datos obtenidos a lo largo de esta Tesis por las diferentes técnicas (DC, UV-vis, ESI-MS e ITC) parece evidente que uno de los parámetros más significativos son las constantes de afinidad (K) calculadas por ITC. Hay que tener en cuenta que con estos experimentos se evaluó el desplazamiento de Zn(II) por Pb(II) a pH 4.5, con lo cual no solamente se cuantificó la afinidad por Pb(II) sino también la facilidad de liberar el Zn coordinado a dicho pH, que difiere de las condiciones fisiológicas. Los valores de K calculados a 25 °C permitían realizar la siguiente gradación:



Relacionando la gradación anterior con el carácter de Zn- o Cu-tioneína de las MTs estudiadas, se puede observar que las proteínas que tienen una mayor constante de afinidad por Pb(II) (K) y, por tanto, un proceso más espontáneo ($\Delta G < 0$) corresponden preferentemente a las clasificadas como Zn-tioneínas: MT1, MT2 y los fragmentos αMT3 y αMT1 , con excepción de Cup1, considerada una Cu-tioneína. Y al contrario, las que tienen una constante de afinidad menor son las clasificadas como Cu-tioneínas, MT3, MT4, y los fragmentos βMT3 y βMT1 .

La excepción más importante en esta gradación es que la MT de levadura Cup1 (marcada en rojo), Cu-tioneína por excelencia, tiene una constante de afinidad similar a la de las Zn-tioneínas, semejante a la de MT2. Este valor inesperado, considerando la correlación observada con las otras proteínas, se puede justificar si se tiene en cuenta la facilidad de esta proteína para liberar el Zn(II) dado su elevado carácter de Cu-tioneína, especialmente a pH ácido.

Otro dato a tener en cuenta de los resultados obtenidos por ITC es el ajuste de las curvas experimentales a las curvas teóricas, considerando un sólo sitio de unión (“one binding site”). Sorprendentemente, se observó que aquellas consideradas como Cu-tioneínas (MT3, βMT3 y βMT1) muestran un buen ajuste entre dichas curvas, indicando que todos los sitios de unión de Pb(II) son equivalentes. En cambio, en el resto de MTs se observó la presencia de procesos secundarios que dificultan el ajuste de ambas curvas, indicando así que existen diferentes sitios de unión de Pb(II).

Los resultados obtenidos por ESI-MS también permiten correlacionar el comportamiento de las MTs al enlazar Pb(II) con su carácter de Zn- o Cu-tioneína. Los dos parámetros más indicativos del carácter metálico de una proteína en presencia de Pb(II) son, por un lado la persistencia de las especies Zn-MT iniciales, y por otro lado, la formación y persistencia de las especies homo (Pb-MT) y heterometálicas (Pb,Zn-MT) formadas.

Todos los experimentos realizados por ESI-MS en diferentes condiciones dan lugar a un mismo comportamiento de cada una de las MTs estudiadas que se refleja perfectamente en los experimentos a 37 °C.

En lo que se refiere a la persistencia de las especies iniciales Zn-MT en presencia de Pb(II), cabe destacar que la presencia de la especie Zn₇-MT2 se observa durante todo el experimento (más de 8 horas), mientras que la especie Zn₇-MT1 desaparece al

añadir Pb(II) para reaparecer posteriormente (al cabo de 1 hora). Por su parte, las especies Zn-MT3, son muy minoritarias en un inicio y desaparecen al cabo de 2 horas. Y en cambio, la isoforma MT4 a pH 7.0 no es capaz de coordinar Pb(II), por lo cual la especie Zn₇-MT4 se mantiene en el tiempo.

Considerando las especies formadas al añadir Pb(II), se pudo apreciar que MT1 da lugar inicialmente a especies homometálicas Pb-MT (Pb₈- y Pb₉-MT1, que tienden a desaparecer después de 2 horas), mientras que MT2 forma especies tanto homo como heterometálicas (entre las que se destacan Pb₇Zn₁⁻, Pb₈Zn₁⁻ y Pb₉-MT2). En relación a MT3 se pudo observar que inicialmente se forman especies heterometálicas con bajo contenido en Pb(II) para dar lugar a especies homometálicas en alto contenido en Pb(II) a lo largo del tiempo (Pb₉- y Pb₁₀-MT3).

En relación con la persistencia de las especies iniciales Zn-MT (sin tener en cuenta el comportamiento anómalo de MT4) se puede considerar la siguiente relación:

(+)Zn-tioneína(-) (-)Cu-tioneína(+)

MT2 > MT1 > MT3

Esta gradación concuerda perfectamente con los resultados recientemente publicados, que muestran un mayor carácter de Zn-tioneína para MT2.^{96,167}

Teniendo en cuenta las especies de Pb(II) formadas y su evolución con el tiempo, se puede considerar la especificidad por Pb(II), tanto inicialmente como a lo largo del tiempo:

Inicial: MT1 > MT2 > MT3

Final: MT3 > MT2 > MT1

La mayor facilidad de MT1 para coordinar Pb(II) inicialmente se correlaciona con el mayor valor de K calculado por ITC. Mientras que la mayor persistencia de las especies Pb-MT3 con el tiempo concuerdan con su papel como detoxificador de este metal y la importancia que esto conlleva, ya que esta MT se encuentra ubicada en el cerebro.

Por último, los espectros de masas de la MT de levadura Cup1, considerada Cu-tioneína por excelencia, muestran que esta proteína presenta habilidad coordinante frente a Pb(II), formando clústeres homometálicos y heterometálicos de Pb(II) que se mantienen estables en el tiempo, que suman la mayoría entre 4 y 5 iones (Pb₃Zn₁⁻, Pb₄⁻, Pb₅-Cup1), y baja abundancia de las especies iniciales de Zn(II). Las especies formadas así como la evolución de éstas no se asemejan a ninguna de las otras

proteínas clasificadas como Cu-tioneínas, revelando así un comportamiento singular frente a Pb(II).

El conjunto de resultados considerados de ESI-MS y las relaciones establecidas entre las diferentes proteínas muestran que no hay una relación directa entre el comportamiento de las MTs al coordinar Pb(II) y su carácter de Zn- o Cu-tioneína, ya que como se había dicho anteriormente, en estos experimentos se está considerando tanto el desplazamiento de Zn(II) como la coordinación de Pb(II).

En relación a los dominios Zn₄- α MT, teniendo en cuenta los dos parámetros, ya sea persistencia de la especie inicial Zn-MT y la especie de Pb(II) que se forman, se puede indicar que: la especie Zn₄- α MT1 se mantiene estable durante el tiempo y sólo se observa una especie heterometálica minoritaria (Pb₁Zn₃- α MT1). Por su parte, α MT2 es la que presenta mayor especificidad por Pb(II), ya que forma dos especies homometálicas, Pb₅- y Pb₆- α MT2, de mayor abundancia que se mantienen en el tiempo (en condiciones de exceso de Pb(II)) y la especie inicial de Zn(II) desaparece. Y α MT3 forma clústeres homometálicos de Zn(II), así como especies homo y heterometálicas de Pb(II), pero al pasar el tiempo esta proteína libera todos los metales formando la apo- α MT3. En cuanto a la gradación de Zn-tioneína de estos dominios, se puede proponer que α MT1 es la que tiene un mayor carácter de Zn-tioneína, debido a que mantiene coordinados los iones Zn(II). Y la de menor carácter de Zn-tioneína sería α MT3, ya que prefiere liberar sus metales que enlazar un metal divalente como Pb(II). En base a estos datos la gradación sería la siguiente:

(+) Zn-tioneína (-)

α MT1 > α MT2 > α MT3

Por otro lado, los espectros de ESI-MS de los dominios Zn₃- β MT, nos revelan que β MT1 y β MT2 presentan una mayor habilidad coordinante frente a Pb(II), de manera similar formando un clúster de mayor abundancia, Pb₄- β MT. Mientras que, β MT3 forma especies de bajo contenido en Pb(II) y los clústeres como Zn₁-, Pb₁Zn₁- β MT3 y la forma apo- β MT3 son estables en el tiempo. En relación a la gradación del carácter de Cu-tioneína entre estos fragmentos, se puede proponer lo siguiente:

(+) Cu-tioneína (-)

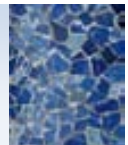
β MT3 > β MT1 ~ β MT2

Considerando los datos espectroscópicos registrados por DC y UV-vis se ha observado que las MTs al coordinar Pb(II) presentan dos comportamientos diferentes: las señales de *tipo I*, correspondientes a las cuatro bandas por UV-vis y a las siete

absorciones por DC (doble M); y las de *tipo II*, con dos absorciones en el UV-vis y espectros con pocas bandas y bajas intensidades en el DC. También se observó una relación entre las especies formadas y estas señales: las proteínas que mayoritariamente forman especies homometálicas de Pb(II) presentan las absorciones de *tipo I*; mientras que las que forman especies de Pb(II), tanto homo como heterometálicas, presentan comúnmente absorciones de *tipo II*.

Sorprendentemente, no se observó una correlación directa entre las señales de DC y UV-vis que aparecen al estructurarse las MTs frente a Pb(II), y el carácter de Zn- o Cu-tioneína de estas proteínas (Tabla 46 y 47). En este estudio se observaron señales de *tipo I*, intensas y definidas (Fig. 213A, 215B y 217A), análogas para MT1 y MT2 (Zn-tioneínas) y también para β MT1, β MT2 y MT4 (que sólo coordina el ión Pb(II) a pH 4.5) que tienen un mayor carácter de Cu-tioneína, todas ellas con una gran habilidad por coordinar Pb(II). A su vez, los espectros de *tipo II* se observaron para MT3, β MT3 y Cup1 consideradas más próximas a las Cu-tioneínas (Fig. 217B), y también obtenidos para los fragmentos α MT estudiados (un mayor carácter de Zn-tioneína). Estos resultados son indicativos de que la estructuración de las especies formadas y sus absorciones características dependen más bien de la capacidad para enlazar Pb(II) de cada MT que de su especificidad metálica frente a Cu(I) y Zn(II).

V. CONCLUSIONES



V. Conclusiones

A partir del análisis de los resultados obtenidos mediante espectroscopía (DC y UV-vis), espectrometría de masas (ESI-MS) y microcalorimetría (ITC), en el estudio del comportamiento de las MTs de mamífero frente al ión Pb(II) con la finalidad de entender el posible papel de estas proteínas como agentes detoxificadores de plomo, se puede concluir que:

- El comportamiento de las MTs de mamífero frente a Pb(II) es muy complejo y particular para cada una de las proteínas estudiadas, tanto por las características propias de éstas como por las propiedades de este ión metálico, de manera que no se pueden hacer extrapolaciones del comportamiento de una determinada MT frente a Pb(II) para predecir cómo se comportarían otras isoformas en las mismas condiciones. De las cuatro isoformas de mamífero MT3 es la que presenta un comportamiento más diferente al de las otras. En cambio, MT1 y MT2 son muy similares, tanto en las especies de Pb(II) que forman como en su estructuración. Por su lado, MT4 se asemeja a éstas únicamente cuando coordina Pb(II) a pH 4.5.
- En condiciones fisiológicas (pH 7.0 y 37 °C), la MT del cerebro, MT3, muestra la mayor capacidad detoxificadora frente a Pb(II), seguida de MT2 y MT1, mientras que MT4 no coordina Pb(II) a pH neutro. Consecuentemente, MT1, MT2 y MT3 pueden actuar como agentes detoxificadores de Pb(II) en condiciones fisiológicas.

Adicionalmente, al examinar los diversos factores que determinan la formación y estabilidad de las especies Pb-MT se puede concluir que entre los factores estudiados, el que presenta una mayor influencia es el pH, ya que en algunos casos determina la coordinación de Pb(II) a la proteína y el tipo de coordinación que presenta el ión Pb(II) en la proteína. El segundo es la temperatura, relacionada con los tiempos de estabilización de las especies Pb-MT formadas y su estructuración, así como el tipo de coordinación. La concentración ejerce un efecto menor en la coordinación de Pb(II).

Por otra parte, respecto a la relación del comportamiento de estas MTs frente a Pb(II) de acuerdo a su carácter de Zn- o Cu-tioneína, se puede concluir que:

- El carácter de Zn- o Cu-tioneína no determina de manera unívoca la coordinación de las MTs frente a Pb(II), sino que más bien es la especificidad que tienen éstas por el ión Pb(II) lo que más influye.

Sin embargo, el carácter de Zn- o Cu-tioneína influye en el tipo de coordinación del ión Pb(II) a las proteínas enteras estudiadas, aunque no al que muestra el Pb(II) cuando se coordina a los fragmentos:

- Las que tienen un mayor carácter de Zn-tioneína, como MT1 y MT2, coordinan Pb(II) dando lugar a absorciones de “*tipo I*” (250, 330, 375 y 400 nm en el UV-vis y en el DC siete señales que forman una doble M), empleando un tiempo de estabilización relativamente grande (superior a 3 horas).
- Las de mayor carácter de Cu-tioneína, como MT3 y Cup1, prefieren un tipo de coordinación que requiere tiempos de estabilización cortos (entre 10 min y 1 hora), observándose absorciones de “*tipo II*” (dos bandas a 250 y 350 nm aprox. en el UV-vis y en el DC señales de baja intensidad y poco definidas).

VI. PARTE EXPERIMENTAL



VI. Parte Experimental y Técnicas Utilizadas

En este apartado se exponen los procedimientos experimentales y las técnicas utilizadas que han permitido caracterizar las preparaciones de proteína utilizadas y los complejos metal-MT obtenidos en esta Tesis Doctoral.

1. Procedimientos experimentales

En todas las valoraciones y análisis se ha utilizado agua ultrapura Mili-Q. Además, todo el material de vidrio ha sido lavado con HNO₃ al 20% y luego con agua ultrapura.

Las diferentes metalotioneínas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas de forma recombinante y las preparaciones obtenidas fueron caracterizadas mediante diversas técnicas analíticas: ICP-AES, ESI-TOF-MS, DC y absorción UV-vis. El estudio de habilidad coordinante de las MTs seleccionadas frente a Pb(II), así como el estudio de los factores experimentales que puedan afectar esta coordinación, se llevó a cabo mediante el uso de DC, absorción UV-vis, ESI-TOF-MS e ITC. A continuación se detallan algunas de las características más importantes de las técnicas y procedimientos utilizados.

- **Obtención y caracterización de las metalotioneínas**

La síntesis y purificación de todas las MTs recombinantes estudiadas en esta Tesis Doctoral ha sido llevado a cabo por el grupo de investigación dirigido por la Dra. Sílvia Atrian, Catedrática de Genética de la Universitat de Barcelona. Las MTs fueron producidas mediante ingeniería genética con la técnica del ADN recombinante a través de la introducción del gen que las codifica en células de la bacteria *E. coli*. Las proteínas utilizadas han sido las 4 isoformas de MTs de mamífero, y sus dominios constitutivos α y β , además de la isoforma Cup1 de levadura. Todas ellas fueron producidas en cultivos enriquecidos con Zn(II) y posteriormente purificadas por cromatografía de afinidad y de exclusión por tamaño, siendo finalmente eluidas en una solución tampón de Tris-HClO₄ 50 mM a pH 7.0 y guardadas a -80 °C hasta su uso.

En todas las producciones las proteínas fueron obtenidas con una pureza superior al 95% y unas concentraciones elevadas, alrededor de 10⁻⁴ M.

Para llevar a cabo la caracterización de las diferentes preparaciones Zn-MT, primero se comprobó la integridad de la cadena peptídica, realizando el análisis de cada preparación por espectrometría de masas a pH ácido, que permite observar la forma apo de las proteínas y así la determinación de su peso molecular. Posteriormente, se determinaron mediante ESI-MS a pH 7.0, el número de especies presentes en solución

y su estequiometría. Las medidas de la concentración de la proteína y de la cantidad de metal presente en la preparación tuvieron lugar vía la determinación de la concentración de azufre y zinc por ICP-AES. Por último, el estudio del plegamiento de la proteína alrededor de los iones Zn(II) se llevó a cabo por DC.

- Caracterización de las especies Pb(II)-MT formadas

La caracterización de las especies Pb-MT formadas bajo las diferentes condiciones experimentales ensayadas en esta Tesis tuvo lugar básicamente por métodos espectroscópicos. El enlace de los iones Pb(II) a las diversas MTs se observó por DC y absorción UV-visible. Las especies Pb-MT formadas fueron registradas por ESI-MS, y además, en el caso de las proteínas enteras, los valores termodinámicos asociados al desplazamiento de Zn(II) por Pb(II) fueron obtenidos por métodos calorimétricos, ITC.

2. Técnicas utilizadas

A continuación se explican brevemente las características de las técnicas utilizadas para la caracterización de las especies Zn-MT y el estudio de la habilidad coordinante de estas MTs frente a Pb(II).

- Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES)

Esta técnica espectroscópica permite analizar una gran variedad de elementos, especialmente metales. Se basa en la atomización completa de la muestra mediante el plasma utilizado, y posteriormente se irradia la muestra atomizada a la longitud de onda adecuada para excitar los electrones de valencia del elemento que se quiere analizar. Posteriormente, estos electrones se relajan de manera espontánea y la emisión correspondiente se puede correlacionar con la cantidad del elemento en la muestra y su concentración.

En esta Tesis, mediante esta espectroscopía se ha cuantificado el contenido metálico de Zn y Cu, así como también se ha determinado la concentración de proteína mediante la medida de la concentración de azufre. Ya que el contenido de S en las proteínas estudiadas viene dado por la cantidad de Cys y Met presentes en su estructura primaria, y como la secuencia de las proteínas utilizadas es perfectamente conocida, se ha podido relacionar unívocamente la concentración de S en las muestras con la de proteína.

Para la cuantificación de los elementos considerados, S, Zn y Cu, se prepararon soluciones con un volumen entre 75 y 200 μL de muestra y añadiendo HClO_4 al 2%

(v/v) hasta completar un total de 3 mL. Se prepararon patrones de diferentes concentraciones de cada uno de los elementos a analizar a partir de patrones estandarizados de 1000 ppm con el fin de construir las rectas de calibrado de los 3 elementos (Zn, Cu y S). Se midió cada una de las soluciones patrones, que contenían entre 0.3 y 3 ppm de cada elemento, y se construyó una recta para cada elemento. Posteriormente, en dicha recta se interpoló la muestra medida para así obtener la concentración de cada elemento.

En todas las medidas realizadas, la masa de la proteína y la masa de la solución total han sido medidas en una balanza de precisión.

El equipo utilizado fue un espectrómetro Polyscan 61E (Thermo Jarrel Ash Corporation, Franklin, MA, USA), de los Servicios Cientifíco-técnicos de la UB. Este analizador, basado en una total atomización y ionización de la muestra en un plasma de argón, trabaja en las longitudes de onda 182.04 nm (S), 213.85 nm (Zn) y 324.75 nm (Cu).

Cabe mencionar que si bien los límites de cuantificación (concentraciones mínimas de analito que se puede cuantificar) de esta técnica son bastante bajos para los metales seleccionados, por debajo de 0.05 ppm, en el caso del S este límite es bastante más alto, de unos 0.5 ppm. Este hecho, que es una de las limitaciones de esta técnica analítica, hace que algunas de las medidas cuantitativas tengan un error considerable, pero los datos seleccionados siempre han mostrado unos valores de RSD inferior al 5%.

- ***Espectroscopía de absorción de UV-visible (UV-vis)***

La espectroscopía de absorción UV-visible se basa en la absorción de luz con energía en el rango UV-vis (190-800 nm) por parte de una muestra que contiene moléculas capaces de absorber dicha luz, ya que promueven el paso de electrones desde orbitales ocupados de alta energía a estados excitados de baja energía. La separación energética entre estos orbitales, o sea el salto energético promovido, se encuentra en la zona de la luz UV-visible. Se denomina *cromóforo* a la parte de una molécula que absorbe radiación, en este caso en la zona UV-vis. Por lo tanto, la espectroscopía de UV-vis mide las transiciones electrónicas de los cromóforos debidas a la absorción de luz en este rango de longitud de onda.

Las bandas de absorción UV-vis observadas son normalmente anchas, debido a que los niveles vibracionales y rotacionales de la molécula se encuentran superimpuestos sobre los niveles electrónicos, de manera que habitualmente nos referimos a la longitud de onda máxima de absorción (λ_{max}).

En el estudio de proteínas, los espectros de absorción UV-vis muestran absorciones que proporcionan información sobre el enlace peptídico (entre 190 y 220 nm) y sobre la

presencia de aminoácidos aromáticos (cerca de 280 nm). Además, en el caso que exista enlace metal-proteína, se pueden observar absorciones por encima de 220 nm relacionadas con dicho enlace y sobre la estereoquímica de coordinación de dichos centros metálicos. La ausencia de aminoácidos aromáticos en las MTs consideradas permite suponer que las absorciones que aparecen por encima de 220 nm son debidas únicamente a la coordinación metal-MT. Si bien la información obtenida por los espectros, que generalmente presentan bandas muy amplias, es limitada, sin embargo la evolución de las absorciones observadas cuando se produce una alteración del sistema (cambio de pH o temperatura, adición de iones metálicos, etc.) permiten obtener información adicional del sistema en estudio, como es el punto de saturación de la proteína, la formación o destrucción de un cromóforo o la formación de un determinado tipo de enlace, entre otros.

Una estrategia alternativa utilizada en este trabajo es la representación de lo que se ha denominado “espectros de diferencia de UV-vis”, que consiste en restar los espectros de absorción de adiciones consecutivas, por ejemplo 4-3 Pb(II) añadidos, obteniéndose así la contribución del 4º eq de Pb(II) a la especie formada. De esta manera se puede observar el efecto provocado sobre el sistema por la adición de un determinado equivalente, independientemente de los cromóforos que se hayan formado o destruido con anterioridad. El resultado son bandas más definidas que permiten observar con mayor claridad los máximos y determinar si se ha producido la formación o la destrucción de un cromóforo determinado. Además, se obtiene información relacionada directamente con los cambios estructurales de las especies formadas a lo largo de las valoraciones de las MTs con Pb(II).

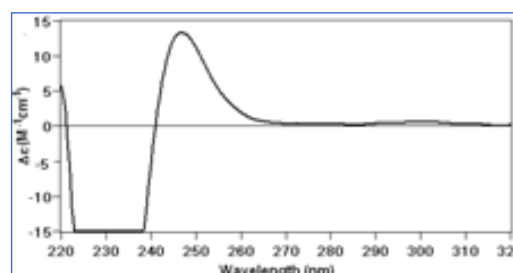
Los espectros de absorción UV-visible se han registrado en un espectrofotómetro Hewlett-Packard, modelo HP-8453 de *diode array* (GMI Inc., Ramsey, MN, USA), que pertenece al Servicio de Análisis Química de la UAB (SAQ). Todas las medidas se realizaron en un rango entre 200 y 800 nm, con una resolución de 0.5 nm, con una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Se utilizó como blanco una solución 50 mM de Tris-HClO₄ (la misma concentración de tampón de las muestras de proteína) a pH 4.5 o 7.0.

- **Espectroscopía de Dicroísmo Circular (DC)**

La espectroscopía de DC se basa en la absorción por parte de un cromóforo ópticamente activo de una luz incidente polarizada en un plano. Se puede considerar que esta luz polarizada linealmente está formada por dos haces de luz polarizadas circularmente en sentidos opuestos. La absorción desigual de los dos haces de luz por parte de un cromóforo ópticamente activo se traduce en la existencia de dos coeficientes de extinción molar, ϵ_i y ϵ_d , es decir, la luz polarizada circularmente en el

sentido izquierdo (i) es absorbida con diferente intensidad que la del sentido derecho (d). La variación de los coeficientes de extinción molar, $\Delta\epsilon = |\epsilon_i - \epsilon_d|$, en función de la longitud de onda de la radiación incidente constituye la base de los espectros de dicroísmo circular. Las bandas de los espectros de DC pueden ser de dos tipos: gaussianas y en forma de derivada. Una banda gaussiana indica la existencia de cromóforos idénticos pero independientes. En cambio, cuando dos o más cromóforos idénticos, conectados por enlaces σ , se orientan adecuadamente para establecer interacciones mutuas, apareciendo un acoplamiento denominado *exciton coupling*, que transforma la banda gaussiana en otra en forma de primera derivada (Fig. 225).

Figura 225. Espectro de DC de la isoforma de mamífero Zn₇-MT1 que muestra una banda en forma de *exciton coupling* a 240 nm, característica de la absorción del cromóforo Zn(Cys)₄.



En el caso de las MTs, los cromóforos $[M(SCys)_x]$, que en principio no tendrían por qué ser quirales, se convierten ópticamente activos gracias a la transferencia de la quiralidad propia de la cadena peptídica (L-aminoácidos) a los centros metálicos, hecho que se denomina “quiralidad inducida”.

La espectroscopía de DC proporciona información sobre el plegamiento de la cadena peptídica alrededor de los centros metálicos, sobre el entorno del cromóforo y la quiralidad de los agregados metálicos formados en el complejo metal-MT. Si bien un espectro por sí sólo es difícil de interpretar debido a su complejidad, la comparación entre espectros registrados a diferentes condiciones (pH, concentración de proteína, tiempo de estabilización y temperatura) puede proporcionar datos sobre la interacción metal-MT.

Los espectros de DC han sido registrados en un espectropolarímetro modelo J-715 (JASCO. Gross-Umstadt, Germany) y un software J-700 (JASCO) (SAQ). La temperatura se controló por un aparato Peltier PTC-351 (TE, Techonology Inc., Traverse City, MI, USA). Se ha utilizado una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz para las medidas realizadas en un rango de 200 a 500 nm, a una velocidad de 50 nm/min, con una resolución de 0.5 nm y a las diferentes temperaturas, 25, 37 y 55 °C, según fuese necesario. El blanco empleado es una solución 50 mM de Tris-HClO₄ (la misma concentración de tampón de las muestras de proteína) a pH 4.5 o pH 7.0, en función del experimento realizado. Todas las muestras fueron analizadas bajo una atmósfera de argón para evitar la oxidación de las MTs.

Los espectros de DC y UV-vis han sido tratados (*offset*, *smoothing*, corrección del factor de dilución, transformación de absorción a absorptividad molar) por el programa informático GRAMS/32 (Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA).

- Espectrometría de masas (ESI-TOF-MS)

La espectrometría de masas (EM) se basa en la caracterización de materia mediante la separación y detección de iones en fase gaseosa en base a su masa. La espectrometría de masas comprende aquellas técnicas cuyo resultado final es un espectro de masas donde se relacionan la intensidad (o abundancia) de especies con la misma relación de masa por carga (m/z) presentes en la muestra.

En esta Tesis se ha utilizado la espectrometría de masas con ionización por *electrospray* (ESI-MS) y analizador de tiempo de vuelo (TOF), siendo ésta una técnica ideal para analizar proteínas, que permite poder determinar el número de especies metal-MT presentes en la muestra y la estequiometría de las mismas.

La técnica de ionización por *electrospray* (ESI) es una técnica de ionización suave que, en condiciones óptimas, no provoca la pérdida de los iones metálicos de los complejos metal-MT. Se utiliza típicamente para determinar los pesos moleculares de proteínas, péptidos y otras macromoléculas biológicas de hasta 200 kDa. Esta técnica, a diferencia de otras técnicas de ionización, se caracteriza por la facilidad de obtener iones multicargados (Fig. 226), es decir, moléculas con más de una carga (+2, +3, +4, etc.), lo cual permite obtener una serie de ventajas, principalmente determinar pesos de moléculas muy grandes en un rango de m/z relativamente pequeño y observar diversos picos de la misma especie con diferente carga, aumentando así la precisión de la medida de la masa molecular.

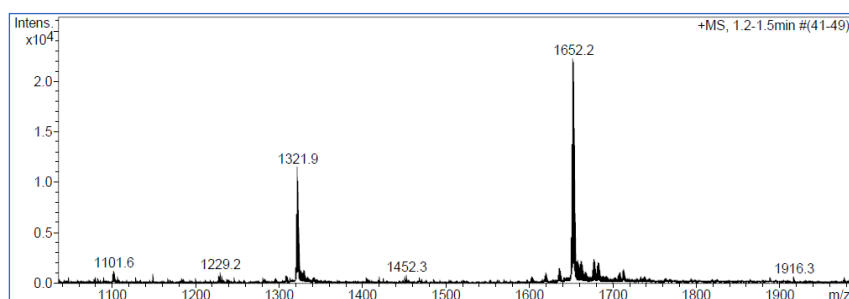


Figura 226. Espectro de masas de la MT de mamífero que muestra los picos Zn_7 -MT1 a diferentes cargas +5 (1321.9) y +4 (1652.2)

Por otra parte, el uso del analizador TOF de alta resolución permite determinar relaciones m/z de manera muy precisa, observándose incluso el perfil (*pattern*) isotópico de cada pico, de manera que para masas relativamente pequeñas se puede

confirmar o descartar la presencia de metales, especialmente para aquellos átomos que tienen un perfil isotópico muy característico. Además, la técnica permite acoplar una bomba de HPLC que facilita poder trabajar bajo diferentes condiciones experimentales de pH y soluciones de tampón.

En este estudio se ha trabajado a diferentes valores de pH y diferentes condiciones experimentales:

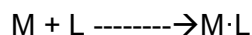
- a pH 7.0 (fase móvil acetato amónico 15 mM y acetonitrilo, 95:5, respectivamente), donde las especies metal-MT se mantienen inalteradas, para la caracterización de las proteínas Zn-MT iniciales y las especies Pb-MT formadas bajo estas condiciones (cuando el Zn(II) está fuertemente unido a la proteína);
- a pH 4.5 (fase móvil de agua Milli Q añadiendo ácido acético hasta llegar a este pH), donde las especies Zn-MT presentes en las MTs de mamífero forman especies heterometálicas de Zn(II), siendo la más abundante Zn₄-MT, seguidas de Zn₃⁻, Zn₅⁻, Zn₂-MT, desplazando a este pH algunos iones Zn(II) enlazados a las MTs a pH neutro.
- a pH 2.4 (fase móvil ácido fórmico 5 mM y acetonitrilo 85:15, respectivamente), condiciones en las cuales los residuos de cisteínas son parcialmente protonados, desplazando los iones Zn(II) coordinados a las MTs, observándose así las especies apo-MT que permite confirmar la secuencia de la proteína.

Los espectros de masas fueron registrados en el espectrofotómetro Micro Tof-Q II 28 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany), del Servicio de Análisis Química de la UAB (SAQ), calibrado con una solución de NaI (200 ppm NaI en H₂O/isopropanol 1:1). Éste tiene acoplado una bomba de HPLC Series 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con un *autosampler*, ambos controlados por el programa informático Compass. Las condiciones experimentales para analizar MTs enlazando Zn(II) y/o Pb(II) han sido: 20 µL de proteína inyectada a través de un tubo largo de PEEK (2.0 x 0.17 mm i.d.) a 45 µL/min; temperatura del inyector a 25 °C; voltaje del capilar de 5000 V; temperatura zona de secado (dry Temp.) 90-110 °C; velocidad de gas de secado (dry gas) 6.0 L/min; rango de m/z 800-2500. La fase móvil consiste en una mezcla de acetato de amonio 15 mM a pH 7.0 o pH 4.5, o una solución de ácido fórmico a pH 2.4.

- **Microcalorimetría por ITC**

La calorimetría isotérmica de titulación (conocida como ITC por sus iniciales en inglés: “*Isothermal Titration Calorimetry*”) es una técnica instrumental capaz de medir la

energía de un proceso de reconocimiento molecular entre una cierta macromolécula, M, y un ligando, L:



donde M representa a la macromolécula (proteína, ácido nucleico, etc) y L al ligando.

La técnica permite determinar un conjunto de parámetros termodinámicos asociados a la reacción en estudio: tanto el cambio de energía libre de Gibbs, ΔG , como la entalpía, ΔH , y la entropía, ΔS , asociados a la reacción.

Como cualquier método de titulación, en un experimento típico de ITC la solución de la macromolécula, M, contenida en la celda calorimétrica a una determinada concentración, $[M]_{\text{cell}}$, se titula con una disolución de ligando mediante una jeringa externa, $[L]_{\text{syr}}$. La celda calorimétrica tiene un volumen fijo y bien conocido de unos 1,4 mL a la que se añaden, de forma secuencial, pequeños volúmenes de ligando, v_{inj} , (2 – 15 μL) hasta que la concentración total del ligando en la celda calorimétrica es suficiente para saturar completamente los centros de unión de la macromolécula (hasta que toda la macromolécula inicialmente libre, M, se ha convertido en el correspondiente complejo, M·L). Como en cualquier técnica calorimétrica, el observable monitorizado es la cantidad de energía en forma de calor, Q_i , que se absorbe o se libera tras la adición de cada volumen de ligando, v_{inj} , a temperatura y presión constante.

Un calorímetro isotérmico de titulación está construido por dos celdas calorimétricas (una de referencia y otra de medida) dentro de un bloque termostatzado a la temperatura deseada, que se mantiene constante (Fig. 227).

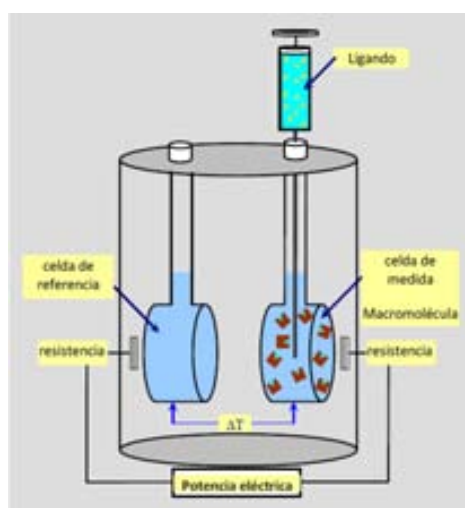


Figura. 227. Representación esquemática de un instrumento de ITC.

La celda de referencia se llena de agua o de la disolución tampón correspondiente y se mantiene cerrada a lo largo del experimento. La disolución de macromolécula se añade en la celda de medida, ocupando todo el volumen disponible. Por su parte, la

disolución de ligando, L, se coloca en la jeringa especialmente diseñada para realizar este tipo de experimentos, que posee una cánula de inyección que tiene forma de agitador. Esta jeringa de inyección, que permite un volumen máximo de 300 μL , está diseñada de tal manera que realiza un movimiento de rotación, de velocidad constante y controlable, que facilita, no sólo la adición secuencial de volúmenes conocidos de la disolución que hay en el interior, sino que además la agitación permite homogeneizar la disolución a lo largo de todo el experimento, de manera que el efecto de cada adición del ligando se pueda apreciar rápidamente.

El instrumento mantiene el bloque termostático, en el que se encuentran ambas celdas, a una temperatura constante de forma rigurosa (éste es un requerimiento esencial de la técnica y la menor variabilidad de la temperatura a la cual se mantiene el bloque termostático está en relación directa con la sensibilidad del instrumento). La temperatura a la que se mantiene las celdas calorimétricas es ligeramente inferior a la cual se va a llevar a cabo el experimento. Como ya se ha dicho, la técnica se basa en medir la variación de calor provocada por la adición del ligando. El calorímetro dispone de sondas de resistencias adosadas a cada una de las celdas calorimétricas (referencia y medida) que le permiten enviar una determinada cantidad de potencia eléctrica a cada una de ellas y mantener a ambas celdas a una misma temperatura. De manera que en realidad, el parámetro resultante del experimento es la potencia necesaria que ha sido necesaria para que las dos celdas tengan la misma temperatura después de la adición correspondiente del ligando. En caso de un proceso exotérmico habrá que calentar la celda referencia, mientras que en caso de un proceso endotérmico se calentará la celda de medida. Después es necesario un tiempo para que el sistema se reequilibre.

El equipo utilizado en los experimentos de ITC para la determinación de las constantes termodinámicas es el Microcal VP-ITC (Northampton, MA, USA). Los experimentos realizados en esta Tesis se han llevado a cabo a pH 4.5, para evitar la precipitación de los iones Pb(II) , y a diferentes temperaturas (25, 37, 45 y 55 $^{\circ}\text{C}$) (ver Tabla 4 en la Metodología Experimental). Las muestras de Zn-MT valoradas tenían una concentración de 10 μM para MTs enteras y 20 μM para los dominios aislados, todas ellas en Tris- HClO_4 50 mM de pH 4.5. La solución de $\text{Pb(ClO}_4)_2$ tenía una concentración final de 1200 μM , en Tris- HClO_4 50 mM pH 4.5. Todas las soluciones fueron preparadas a partir de Tris- HClO_4 200 mM por dilución con agua Mili-Q, todas ellas previamente sonicadas para evitar la presencia de gas disuelto.

Los parámetros termodinámicos resultantes (constante de equilibrio, número estequiométrico, entalpía y entropía) son calculados a partir de las curvas de valoración obtenidas, ajustando los valores experimentales a curvas teóricas mediante el uso del programa de análisis *Origin* específico del equipo. Existen diferentes modelos de ajuste. El programa utiliza un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados mediante el cual las

concentraciones del valorante y de la muestra se ajustan a una ecuación de equilibrio de unión en relación al calor liberado o que se consume en cada inyección. En las reacciones aquí estudiadas, todos los resultados fueron ajustados considerando que todos los centros de unión son equivalentes (*one binding site*).

3. Preparación de las soluciones utilizadas

A continuación se describen las preparaciones de las soluciones utilizadas más relevantes para llevar a cabo los experimentos a lo largo de esta Tesis Doctoral.

- **Solución de agente valorante $Pb(ClO_4)_2$**

Se pesó 0.314 g de $Pb(ClO_4)_2 \cdot 3H_2O$ de 97% de pureza y se disolvió en H_2O Mili-Q. Esta solución se enrasó en un matraz aforado de 100 mL después de añadir ácido perclórico hasta pH 4.5. La concentración de plomo en la solución se determinó por espectrofotometría de absorción atómica de llama, siendo 6.99×10^{-3} M.

- **Soluciones tampón de Tris- $HClO_4$ a pH 4.5 y pH 7.0**

Las soluciones de tampón utilizadas en las medidas espectroscópicas, Tris- $HClO_4$, fueron preparadas a partir del Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) sólido, que se disolvió en la cantidad pertinente de H_2O Mili-Q a la que posteriormente se añadió $HClO_4$ hasta conseguir una solución de Tris- $HClO_4$ 50 mM a pH 4.5 y a pH 7.0. Ésta se ha preparado para cada experimento para asegurar el perfecto estado de la solución utilizada.

- **Soluciones de fase móvil para ESI-MS**

La fase móvil a pH 7.0 y 4.5 se preparó pesando aproximadamente 0.6 g. de acetato de amonio y se disolvió con H_2O Mili-Q en un vaso de precipitado de 300 mL y se ajustó el pH hasta 7.0 ó 4.5 con ácido acético o amoníaco. Finalmente se trasvasó a un matraz aforado de 500 mL y se enrasó.

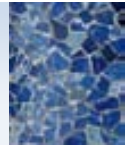
La fase móvil a pH 2.4, se preparó en un matraz con un volumen de 300-500 mL de H_2O Mili-Q a la que se añadió ácido fórmico hasta llegar a este pH.

Todas las soluciones fueron filtradas antes de ser usadas en el HPLC.

- **Solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)**

La solución de EDTA 0.01 M utilizada en los experimentos de ESI-MS se preparó pesando aprox. 0.2 g del sólido y disolviéndola en 50 mL de H_2O Mili-Q para obtener una solución de concentración 0.01 M. El pH de la solución, que inicialmente era de 4.6, se ajustó añadiendo NH_3 hasta conseguir el pH 7.0.

VII. ANEXO



VII. Anexo

Anexo 1. Tabla de datos construida a partir de las estructuras depositadas en el CSD referente a los números y entornos de coordinación de los compuestos de Pb(II).

Números de coordinación												
Átomo(s) dador	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total
Sólo N	5	7	10	5	3	2	-	1	-	-	-	33
Sólo O	22	5	8	9	6	4	3	3	7	1	-	68
Sólo S	3	1	10	2	1	1	-	-	1	-	-	19
Sólo X(=F,Cl,Br,I)	14	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	16
Sólo C	9	5	8	2	-	-	-	-	5	-	-	29
N y O	-	4	21	20	45	15	21	10	6	-	-	142
N y S	-	1	9	1	5	3	3	-	-	-	-	22
N y C	-	9	6	3	1	3	-	-	-	-	3	25
N y X	-	4	3	2	17	2	-	-	-	-	-	28
N, O y S	-	-	2	3	4	2	3	1	-	-	-	15
N, O y X	-	-	1	1	4	2	-	-	-	-	-	8
N, S y X	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
N, S y C	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	3
O y S	-	-	11	-	2	2	2	-	-	-	-	17
O y C	-	-	1	2	2	1	-	-	-	-	-	6
O y X	-	-	1	2	4	1	3	-	-	-	-	11
S y C	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	12
S y X	-	1	-	-	2	1	-	-	-	-	-	4
S, O, N y C	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2
Otros	9	14	28	12	8	6	2	-	-	-	-	79
Total n°	62	51	133	66	108	45	37	15	19	1	3	540
Total %	11	9	25	12	20	8	7	3	4	0	1	100

Tabla 61. Datos de CSD de los números de coordinación de compuestos de Pb(II) coordinados a O, N, S, C y halógenos (Br, I, Cl, F) y a la combinación de estos átomos. "Otros" se refiere a compuestos con átomos como P, B y/o con otros metales además de Pb(II) en su esfera de coordinación (algunos como Cu, Si, W, Mo, Sn, Fe, etc).²¹⁸

*En azul se muestran los números de compuestos por átomos dadores y sus combinaciones que se observan en la Fig. 13.

*En rojo se encuentran el porcentaje total por número de coordinación de los compuestos de Pb(II) que se observa en la Fig. 14.

Números de coordinación												
Pb(IV)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total
Total	-	-	4	4	20	15	1	-	-	-	-	44

Tabla 62. Datos extraídos del CSD referente a los números de coordinación de compuestos de Pb(IV)

Anexo 2. Tabla de caracterización de las especies Zn-MT iniciales

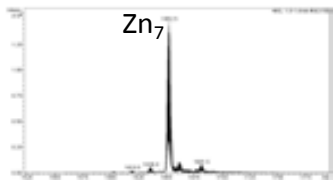
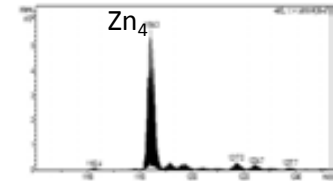
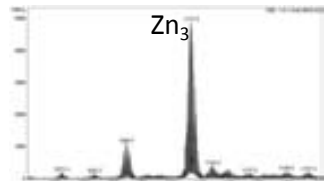
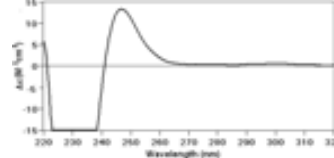
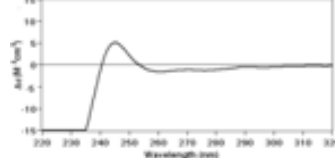
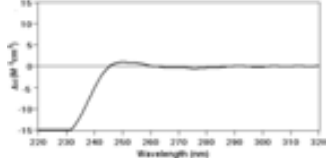
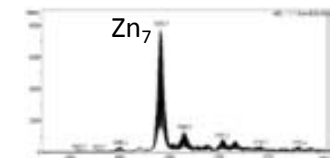
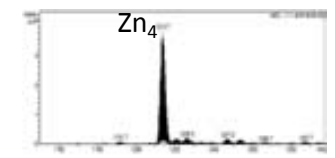
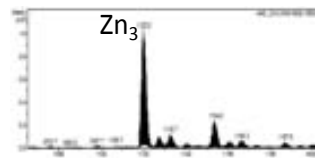
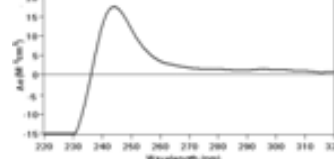
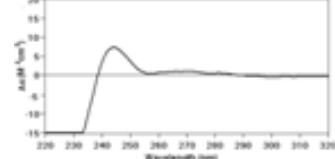
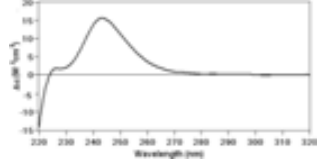
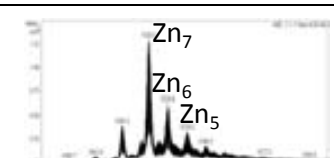
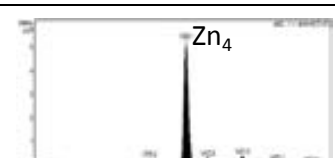
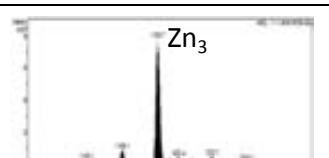
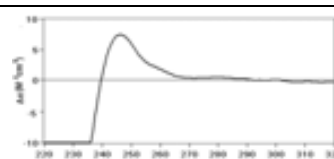
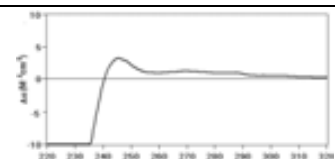
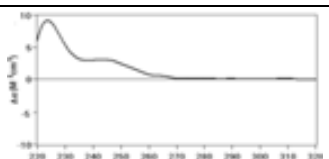
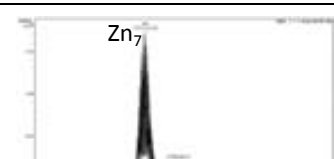
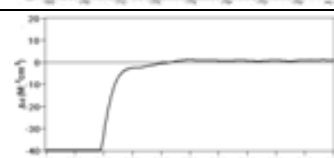
		MT1	α MT1	β MT1
ICP-AES	[prot] (M)	$2.97 \cdot 10^{-4}$	$1.33 \cdot 10^{-4}$	$1.58 \cdot 10^{-4}$
	Zn/MT	6.99	4.29	2.33
ESI-MS				
DC				
		MT2	α MT2	β MT2
ICP-AES	[prot] (M)	$0.38 \cdot 10^{-4}$	$0.93 \cdot 10^{-4}$	$1.10 \cdot 10^{-4}$
	Zn/MT	6.53	3.88	3.05
ESI-MS				
DC				
		MT3	α MT3	β MT3
ICP-AES	[prot] (M)	$1.18 \cdot 10^{-4}$	$2.32 \cdot 10^{-4}$	$1.72 \cdot 10^{-4}$
	Zn/MT	7.58	4.52	3.13
ESI-MS				
DC				
		MT4		
ICP-AES	[prot] (M)	$0.18 \cdot 10^{-4}$		
	Zn/MT	7.40		
ESI-MS				
DC				

Tabla 63. Cuadro resumen de la caracterización por DC, ESI-MS e ICP-AES de las especies Zn-MT de las MTs de mamífero, MT1, α MT1 y β MT1; MT2, α MT2 y β MT2; MT3, α MT3 y β MT3; MT4.

VII. Anexo

Anexo 3. Tablas de absorciones de los espectros de diferencia de UV-vis de las MTs estudiadas frente a Pb(II)

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
20	55	4.5	254, 330, 378, 404	254, 330, 378, 404	254, 330, 378, 404	254, 330, 378, 404	254, 330, 378, 404	250,336,380	250,345	250,325,376	250,325,376
10	55	4.5	254, 330, 378, 404	254, 330, 378, 404	254, 330, 378, 404	254, 330, 378, 404	254, 330, 378, 404	254, 330, 378, 404(d)	270, 337, 380	255, 326, 371, 400	256, 326, 373, 400
5	55	4.5	254, 330, 378, 405	260, 344, 384	254, 330, 378, 405	250, 358	260, 330, 378, 405	254, 330, 404	286, 345, 385	260, 356	-----
5	55	7.0	256, 346	256, 346	330, 375	263, 337, 375	260, 290, 330, 375	255, 350, 380	266, 293, 330, 380, 403	360	295, 360
10	37	7.0	250, 350	250, 350	255, 330, 375, 402(d)	254, 352	258, 330, 378, 402(d)	330, 378, 403	260, 330, 378, 405(d)	253, 330, 378, 403(d)	260, 330, 378, 405(d)
10	55	7.0	252, 340	252, 340	262, 328, 378, 405	256, 350	255, 330, 378, 406	253, 350	256, 330, 378, 404	260, 330, 379, 404	250, 350, 380
20	55	7.0	255, 337, 381	255, 330, 376, 405	256, 330, 376, 405	255, 337, 381	267, 330, 378, 405	250,350, 385	267, 330, 378, 405	258, 362	246, 297, 350, 386

Tabla 64. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en las valoraciones de Zn₇-MT1 a diferentes condiciones experimentales.

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
20	25	4.5	248, 343	248, 343	248, 340	248, 340	248, 330, 378, 401	252, 337, 380	252, 324	-	-
20	25	7.0	245, 340	250, 360(d)	-	246, 283(d)	262,290, 366	245, 325(d)	244	292, 367(d)	238
20	37	7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 65. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en las valoraciones de Zn_{4- α} -MT1 a diferentes condiciones experimentales.

VII. Anexo

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
20	25	4.5	250, 330, 378, 402	250, 330, 378, 402(d)	256, 332	250, 330, 378	232(p)	232(p)	232(p)	232(p)	291, 320, 368
20	55	4.5	250, 330, 378, 402	250, 330, 378, 402	254, 330, 378(d)	260, 330	260, 330	266	266	----	----
20	55	7.0	254, 334	254, 330, 378, 402	260, 330, 378, 404	359	-	250	222, 250, 337	-----	-----
20	37	7.0	250, 340	250, 330, 378	240, 342	250, 353, 386, 400	250, 302, 353, 386, 400	253, 355, 388	251, 350	---	----

Tabla 66. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en la s valoraciones de Zn₃- β MT1 a diferentes condiciones experimentales.

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
10	37	4.5	252, 330, 377, 401(d)	252, 328, 376, 401(d)	264, 327, 376, 400	250, 333, 378, 400(d)	250, 327, 375, 403	250, 328, 378	254, 333, 378, 400	264, 353, 385	350
10	37	7.0	250, 350	250, 354	252, 355	254, 350	253, 350	255, 330, 378	265, 330, 378	254, 330, 379	252, 328, 378
20	37	7.0	254, 350	254, 350	254, 330, 378	254, 350	271, 328, 378, 402	252, 352	250, 353	254, 343	250, 350
5	37	7.0	253, 343	252, 354	251, 356	252, 350	252, 360	253, 350	250, 340, 375(d)	252, 350, 371(d)	250, 353, 366(d)
10	25	7.0	250, 350	250, 350	250, 350	250, 350	250, 350	250, 350	250, 350	250, 350	247
10	55	7.0	250, 345	254, 378	250, 350	258, 330, 378	254, 350	254, 350	---	-----	-----

Tabla 67. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en la s valoraciones de Zn₇-MT2 a diferentes condiciones experimentales.

VII. Anexo

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
20	25	7.0	248, 345	245, 346	245, 346	245, 346	247, 346	244, 346	250, 350	247, 354	250, 284, 364, 400
20	55	7.0	250, 344	250, 344	247, 346	250, 350	248, 354	-	-	-	-

Tabla 68. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en las valoraciones de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT2}$ a diferentes condiciones experimentales.

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
20	25	7.0	250, 346	244, 346	246, 346	246, 346	246, 346	246, 346	248, 353	250, 350	250, 330, 380(d)
20	37	7.0	249, 347	257, 332, 375	248, 350, 380(d)	246, 352	246, 352	250, 352	252, 330, 376	409	250, 350
20	55	7.0	250, 344	264, 330, 378, 403	245, 344	332, 379	-	-----	-----	-----	-----

Tabla 69. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en las valoraciones de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT2}$ a diferentes condiciones experimentales.

VII. Anexo

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
5	55	4.5	245, 333, 376	247, 348	250, 350	242, 315, 387	252, 312, 386	266, 313, 389	276, 314, 390	---	----
10	25	4.5	247, 343	249, 348	247, 352, 385(d)	263, 315, 386	256p, 330, 386	252, 330, 395	264, 330, 401(d)	220, 330, 390(d)	-----
10	55	4.5	250, 344	250, 348	245, 350, 383(d)	260, 316, 386	263, 312, 381	270, 314, 386	262, 318, 386	262, 318, 386	-----
20	55	4.5	249, 340	248, 344	248, 350	248, 357	249, 315, 381	248, 315, 385	248, 315, 385	317, 395	317, 389
10	25	7.0	251, 342	250, 350, 386(d)	250, 350, 386(d)	246, 350, 386(d)	246p, 330	233p, 330, 394p	233p, 328, 397	-	-
10	37	7.0	252, 340	250, 349	250, 350	250, 352	248, 350	253, 360	253, 312, 375	253, 312, 385	253, 313, 385
10	55	7.0	253, 340	252, 350, 386(d)	253, 312(d), 353, 395(d)	251, 312(d), 353, 385(d)	253, 310(d), 353, 385(d)	255, 312, 386	265, 312, 386	270, 317, 386	318, 405
20	37	7.0	252, 340	252, 343	252, 343	248, 347	249, 347	249, 348	250, 348	252, 346	258, 346, 385(d)
5	37	7.0	343	251, 347	251, 350	251, 350, 375(d)	251, 350	249, 350	247, 350	250, 352	248, 315, 380(d)

Tabla 70. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en las valoraciones de la preparación Zn-MT3 a diferentes condiciones experimentales.

VII. Anexo

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
20	25	4.5	246, 332, 378, 403	246, 340, 382(d)	246, 340, 381(d)	240, 340, 381(d)	240, 336	241, 275, 335, 396	236p, 276	279	-
20	25	7.0	247, 340	245, 340, 378(d)	245, 340, 378(d)	245, 340, 378(d)	245, 340, 378(d)	247, 290(d), 396, 350(d)	254, 293, 340(d), 399	241p, 286, 399	233p, 286, 396
20	37	7.0	248, 343	249, 337, 378(d)	249, 337, 378(d)	249, 343, 380(d)	244, 340, 382	242, 293(d), 346(d), 398	234, 289, 399	233p, 288, 330	-

Tabla 71. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en las valoraciones de $\text{Zn}_4\text{-}\alpha\text{MT3}$ a diferentes condiciones experimentales.

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
20	25	4.5	246, 330	246, 332	246, 332	250, 336	255p, 336p	272p, 332p	272p, 332p	269p, 329p	270, 330
20	25	7.0	252, 336	252, 339	243, 340	240, 346	248, 306p, 407(d)	250, 350	255, 308	263, 360p	253, 324p
20	37	7.0	252, 340	250, 340, 378(d)	243, 350, 389(d)	-	241, 300(d)	249, 300(d)	252, 300(d)	224, 252, 330	229, 329

Tabla 72. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en las valoraciones de $\text{Zn}_3\text{-}\beta\text{MT3}$ a diferentes condiciones experimentales.

VII. Anexo

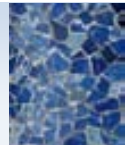
Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
10	25-37-55	4.5	253, 328, 376, 402	256, 327, 376, 401	251, 329, 375, 400	249, 330, 380, 406	255, 339p, 377p	251, 350, 381p	249, 346	300p, 350p, 387p	274p, 329, 374, 398p
10	37	7.0	242, 279p, 340, 375(d)	248, 290p, 357p	263	-	245, 330p, 378p	-	246, 334, 378	-	277
10	55	7.0	245, 344	248, 350	260, 343	-	246, 341p	256, 298p, 350p	-	-	-

Tabla 73. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en las valoraciones de Zn₇-MT4 a diferentes condiciones experimentales.

Condiciones			Equivalentes de Pb(II)								
μM	$^{\circ}\text{C}$	pH	1-0	2-1	3-2	4-3	5-4	6-5	7-6	8-7	9-8
20	25	4.5	252, 334	243, 337	241, 337	235, 338	231, 318	226, 317	-	-	291
20	45	4.5	244, 335	244, 340	244, 340	240, 340	240, 345p	240, 316	246, 330	----	----
10	45	4.5	250, 337	246, 338	246, 338	252, 340	251, 337	257, 335	274p, 320d, 358d	270p, 313p	277p, 318, 355
5	55	4.5	247p, 336	247p, 336	245p, 338	250p, 341	250p, 337	250p, 337	250p, 337	253p, 328p	258p, 329
20	25	7.0	252, 340	247, 338	246, 337	245, 338	243, 340	241, 334	240, 330	240, 323	236, 317
10	25	7.0	250, 340	245, 340	242, 340	250p, 334	240p, 330	230p, 320	226p, 324	231p, 323	230, 320
5	55	7.0	251, 344	248, 344	248, 345	248p, 366p	220p, 246p	242p, 320p	240p	240p, 278, 330p	---

Tabla 74. Absorciones de los espectros de dif. UV-vis para cada equivalente de Pb(II) añadido en las valoraciones de la preparación Zn-Cup1 a diferentes condiciones experimentales.

VIII. BIBLIOGRAFÍA



VIII. Bibliografia

- ¹ J.H. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **1960**, 235, 3460.
- ² J.H. Kägi, B.L. Valle, *J. Biol. Chem.*, **1961**, 236, 2435.
- ² J.H. Kägi, B.L. Valle, *J. Biol. Chem.*, **1961**, 236, 2435.
- ² M.H. Kägi, B.L. Valle, *Biochem. J.*, **1961**, 123, 629.
- ³ M. Capdevila, S. Atrian, *J. Biol. Chem.*, **2011**, 16, 977.
- ⁴ M. Capdevila, R. Bofill, Ò. Palacios, S. Atrian, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256, 46.
- ⁵ T.T. Ngu, M.J. Stillman, *Dalton Trans.* **2009**, 5425.
- ⁶ J. Chan, Z. Huang, M.E. Merrifield, M.T. Salgado, M.J. Stillman, *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, 233-234, 319.
- ⁷ M.J. Stillman, *Coord. Chem. Rev.*, **1995**, 144, 46.
- ⁸ G.F. Nordberg, M. Nordberg, M. Piscator, O. Vesterberg, *Biochem. J.*, **1972**, 126, 491.
- ⁹ J.H. Kägi, *8th Int. Congr. Biochem. Abstract*, **1970**, 130.
- ¹⁰ S. D'Auria, V. Carginale, R. Scudiero, O. Creszenci, D. Di Maro, P. Temussi, E. Parisi, C. Capasso, *Biochem. J.*, **2001**, 354, 291.
- ¹¹ M. Margoshes, B.L. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 4813.
- ¹² M.J. Stillman, C.F. Shaw, III, K.T. Suzuki, *Metallothioneins. Synthesis, Structure and Properties of Metallothioneins Phytoquelatins and Metal-Thiolate Complexes* (Eds.), VCH Publishers, New York, **1992**.
- ¹³ I. Bremner, *Prog. Food Nutr. Sci.*, **1987**, 11, 1.
- ¹⁴ J.H. Kägi, *Methods Enzymol.*, **1991**, 205, 613.
- ¹⁵ R.D. Palmiter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 8428.
- ¹⁶ P. Coyle, J.C. Philcox, L.C. Carey, A.M. Rofe, *Cell Mol. Life Sci.*, **2002**, 59, 627.
- ¹⁷ Y. Uchida, K. Takio, K. Titani, Y. Ihara, M. Tomonaga, *Neuron*, **1991**, 7, 337.
- ¹⁸ C.J. Quafe, S.D. Findley, J.C. Erikson, G.J. Froelick, E.J. Kelly, B.P. Zambrowicz, R.D. Palmiter, *Biochem.*, **1994**, 33, 7250.
- ¹⁹ P. Coyle, J.C. Philcox, A.M. Rofe, *Biochem. J.*, **1995**, 309, 25.
- ²⁰ Y. Takahashi, Y. Ogra, K.T. Suzuki, *J. Cell. Physiol.*, **2005**, 263, 563.
- ²¹ M. Nordberg, Y. Kojima, in *Metallothionein*, Ed. J.H. Kägi, M. Nordberg, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart, **1979**, 41.
- ²² M. Nordberg, in *Ethnic Differences in Reactions to Drugs and Xenobiotics*, Ed. W. Kalow, H.E. Goedde, Alan R. Liss Inc., New York, **1986**, 401.
- ²³ M. Nordberg, *Talanta*, **1998**, 46, 243.
- ²⁴ J.H. Kägi, en K.T. Suzuki, N. Imura, M. Kimura (eds.), *Metallothionein III*, Birkhäuser, Basel, **1993**, 29.
- ²⁵ R. Nath, R. Kambadur, S. Gulati, V.K. Paliwal, M. Sharma, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1988**, 27, 41.
- ²⁶ G.K. Andrews, *Biomaterials*, **2001**, 14, 223.
- ²⁷ D. Egli, J. Domenech, A. Selvaraj, K. Balamurugan, H. Hua, M. Capdevila, O. Georgiev, W. Schaffner, S. Atrian, *Genes Cells*, **2006**, 11, 647.
- ²⁸ S. Díaz, F. Amaro, D. Rico, V. Campos, L. Benítez, et. al., *PLoS ONE*, **2007**, 2(3), e291.
- ²⁹ F. Dondero, M. Cavletto, A.R. Chezzi, A. La Terza, M. Banni, A. Viarengo, *Protist*, **2004**, 155, 157.
- ³⁰ F. Boldrin, G. Santovito, A. Formigari, Y. Bisharyan, D. Cassidy-Hanley, T.G. Clark, E. Piccinni, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, **2008**, 147, 232.
- ³¹ O. Leszczyszyn, S. Zeitoun-Ghandour, S. Stürzenbaum, C. Blindauer, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 448.
- ³² J. Domenech, Ò. Palacios, L. Villarreal, P. Gonzalez-Duarte, M. Capdevila, S. Atrian, *FEBS Letters*, **2003**, 533 (2), 72.
- ³³ M. Valls, R. Bofill, N. Romero-Isart, et al., *FEBS Letters*, **2000**, 467 (2-3), 189.
- ³⁴ C. Ding, R. Festa, Y-L Chen, A. Espart, Ò. Palacios, J. Espín, M. Capdevila, S. Atrian, J. Heitman, D. Thiele, *Cell Host & Microbe*, **2013**, 13, 265.
- ³⁵ K. Munger, U. A. Germann, K. Lerch, *Experientia Suppl.*, **1987**, 52, 393.
- ³⁶ G. Maroni, A. S. Ho, L. Theodore, *Environ. Health Perspect.*, **1995**, 103, 1116.
- ³⁷ Ò. Palacios, S. Atrian, M. Capdevila, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2011**, 16, 991.
- ³⁸ J.H. Kägi, A. Schaffer, *Biochem.*, **1988**, 27, 8509.
- ³⁹ Ò. Palacios, K. Polec, R. Lobinski, M. Capdevila, P. González-Duarte, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2003**, 8, 831.
- ⁴⁰ E. Freisinger, M. Vašák, *Met. Ions. Life Sci.*, **2013**, 11, 339.

- ⁴¹ À. Leiva-Presa, M. Capdevila, P. González-Duarte, *Eur. J. Biochem.*, **2004**, 271, 4872.
- ⁴² Ò. Palacios, À. Leiva-Presa, S. Atrian, R. Lobinski, *Talanta*, **2007**, 72, 480.
- ⁴³ K.E. Duncan, T.T. Ngu, J. Chan, M.T. Salgado, M.E. Merrifield, M.J. Stillman, *Exp. Biol. Med.* (Maywood), **2006**, 23, 1488.
- ⁴⁴ J.D. Otvos, R.W. Olafson, I.M. Armitage, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 2427.
- ⁴⁵ M. Vašák, N. Romero-Isart, *Metallothioneins in Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, 2nd edn., Ed. R. B. King, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, **2005**, 5, 3208.
- ⁴⁶ M. Vašák, A. Galdes, J.H. Kägi, I. Bremmer, B.W. Young, H.A.O. Hill, *Biochem.*, **1980**, 19, 416.
- ⁴⁷ D.R. Winge, K.A. Miklossy, *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257, 3471.
- ⁴⁸ W. Braun, M. Vašák, A.H. Robbins, C.D. Stout, G. Wagner, J.H. Kägi, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 10124.
- ⁴⁹ C. W. Peterson, S. S. Narula, I.M. Armitage, *FEBS Lett*, **1996**, 379, 58.
- ⁵⁰ I. Bertini, H-J Hartmann, T. Klein, G. Liu, C. Luchinat, U. Weser, *Eur. J. Biochem.*, **2000**, 267, 1008.
- ⁵¹ V. Calderone, B. Dolderer, H.J. Hartmann, H. Echner, C. Luchinat, C. Del Bianco, S. Mangani, U. Weser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 51.
- ⁵² K.B. Nielson, C.L. Atkin, D.R. Winge, *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 5342.
- ⁵³ C. A. Blindauer, *Chem. Biodiversity*, **2008**, 5, 1990.
- ⁵⁴ C. A. Blindauer, *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, 102, 507.
- ⁵⁵ A. Pagani, L. Villarreal, M. Capdevila, S. Atrian, *Mol. Microbiol.*, **2007**, 63, 256.
- ⁵⁶ G. P. Borrelly, M. D. Harrison, A. K. Robinson, S. G. Cox, N. J. Robinson, S. K. Whitehall, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 30394.
- ⁵⁷ J. H. Freedman, L. W. Slice, D. Dixon, A. Fire, C. S. Rubin, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 2554.
- ⁵⁸ S. Hughes, S.R. Stürzenbaum, *Environ. Pollut.*, **2007**, 145, 395.
- ⁵⁹ C. A. Blindauer, O. I. Leszczyszyn, *Nat. Prod. Rep.*, **2010**, 27, 720.
- ⁶⁰ C. A. Blindauer, M.D. Harrison, J.A. Parkinson, A.K. Robinson, J.S. Cavet, N.J. Robinson, P.J. Sadler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98, 9593.
- ⁶¹ E.A. Peroza, R. Schmucki, P. Guntert, E. Freisinger, O. Zerbe, *J. Mol. Biol.*, **2009**, 387, 201.
- ⁶² J. D. Otvos, D.H. Petering, C.F. Shaw III, *Comments Inorg. Chem.*, **1989**, 9, 1.
- ⁶³ N. Romero-Isart, M Vašák, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 88, 388.
- ⁶⁴ A.E. Martell, R.D. Hancock, R.J. Motekaitis, *Coord. Chem. Rev.*, **1994**, 133, 39.
- ⁶⁵ A.O. Udom, F.O. Brady, *Biochem. J.*, **1980**, 187, 329.
- ⁶⁶ C. Jacob, W. Maret, B.L. Vallee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 3489.
- ⁶⁷ A. Krezel, W. Maret, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 10911.
- ⁶⁸ C.F. Shaw, M.M. Savas, D.H. Petering, *Methods Enzymol.*, **1991**, 205, 401.
- ⁶⁹ X. Yu, Z. Wu, C. Fenselau, *Biochem.*, **1995**, 34, 3377.
- ⁷⁰ J. Zaia, L. Jiang, M. S. Han, J.R. Tabb, Z. Wu, D. Fabris, C. Fenselau, *Biochem.*, **1996**, 35, 2830.
- ⁷¹ A. Muñoz, F. Laib, D.H. Petering, C.F. Shaw III, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1999**, 4, 495.
- ⁷² P.J. Thornalley, M. Vašák, *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, 827, 36.
- ⁷³ K.D. Kroncke, K. Fehsel, T. Schmidt, F.T. Zenke, I. Dasting, J.R. Wesener, H. Bettermann, K.D. Breunig, V. Kolb-Bachofen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, 200, 1105.
- ⁷⁴ A. Torreggiani, C. Chatgililoglu, C. Ferreri, M. Melchiorre, S. Atrian, M. Capdevila, *J. Prot.*, **2013**, doi:pii: S1874-3919(13)00067-5. 10.1016/j.jprot.2013.02.005.
- ⁷⁵ Y. Luo, Y. Xu, Q. Bao, Z. Ding, C. Zhu, Z.X. Huang, X. Tan, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2013**, 18, 39.
- ⁷⁶ G.J. Michael, S. Esmailzadeh, L.B. Moran, L. Christian, R.K. Pearce, M.B. Graeber, *Neurogenetics*, **2011**, 12, 295.
- ⁷⁷ J. Hidalgo, R. Chung, M. Penkowa, M. Vašák, *Met. Ions Life Sci.*, **2009**, 5, 279.
- ⁷⁸ F. Arnesano, L. Banci, I. Bertini, D.L. Huffman, T.V. O'Halloran, *Biochem.*, **2001**, 40 1528.
- ⁷⁹ S. Helmut (Ed.), *Metal Ions in Biological Systems: Concepts of Metal Ion Toxicity*, vol. 20, Dekker, New York, **1986**, 68.
- ⁸⁰ M. Nordberg, G. Nordberg, *Met. Ions Life Sci.*, **2009**, 5, 11.
- ⁸¹ M. Waalkes, J. Liu, *Met. Ions Life Sci.*, **2009**, 5, 399.
- ⁸² S. Clemens, *Planta*, **2001**, 212, 475.
- ⁸³ M.P. Waalkes, R. Perez-Olle, en: R.K. Zalups, J. Koropatnick (Eds.), *Molecular Biology and Toxicology of Metals*, Taylor & Francis, London, **2000**, 414.
- ⁸⁴ J.C. Rutherford, A.J. Bird, *Eukaryot. Cell*, **2004**, 3, 1.
- ⁸⁵ C.M. Moore, J.D. Helmann, *Curr. Opin. Microbiol.*, **2005**, 8, 188.

- ⁸⁶ K. Balamurugan, W. Schaffner, *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1763, 737.
- ⁸⁷ M. Nordberg, G.F. Nordberg, *Environ. Sci.*, **1996**, 4, 187.
- ⁸⁸ M. Nordberg, G.F. Nordberg, in *Mechanisms of Cell Injury Implications for Human Health*, Ed. B. F. Fowler, Dahlem Konferenzen, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **1987**, 53.
- ⁸⁹ I. Bremner, in *Metallothionein II*, Ed. J.H. Kägi, Y. Kojima, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart, **1987**, 81.
- ⁹⁰ L. Cai, J. Koropatnick, M.G. Cherian, *Chem.-Biol. Interactions*, **1995**, 96, 143.
- ⁹¹ F. Doz, N. Roosen, M.L. Rosenblum, *J. Neurooncol.*, **1993**, 17, 123.
- ⁹² S.E. Theocharis, A.P. Margeli, A. Koutselinis, *Int. J. Biol. Markers*, **2003**, 18, 162.
- ⁹³ B.A. Fowler, C.F. Hildebrand, Y. Kojima, M. Webb, in *Metallothionein II*, ed. J.H. Kägi, Y. Kojima, Birkhäuser Verlag: Basel, **1987**, 52, 19.
- ⁹⁴ M. Valls, R. Bofill, R. González-Duarte, P. Gonzalez-Duarte, M. Capdevila, S. Atrian, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 32835.
- ⁹⁵ R. Bofill, M. Capdevila, S. Atrian, *Metallomics*, **2009**, 1, 229.
- ⁹⁶ E. Artells, Ò. Palacios, M. Capdevila, S. Atrian, *Metallomics*, **2013**, DOI: 10.1039/c3mt00123g.
- ⁹⁷ M. Vašák, G. Meloni, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2011**, 16, 1067.
- ⁹⁸ P. Faller, *FEBS. J.*, **2010**, 277, 2921.
- ⁹⁹ S.G. Bell, B.L. Valle, *ChemBioChem*, **2009**, 10, 55.
- ¹⁰⁰ Y. Li, W. Maret, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2008**, 23, 1055.
- ¹⁰¹ J. H. Kägi, Y. Kojima, *Experientia (suppl.)*, **1987**, 52, 25.
- ¹⁰² A.T. Miles, G.M. Hawksworth, J.H. Beattie, V. Rodilla, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **2000**, 35, 35.
- ¹⁰³ M.G. Cherian, A. Jayasurya, B. H. Bay, *Mutat. Res.*, **2003**, 533, 201.
- ¹⁰⁴ B.A. Masters, C.J. Quaife, J.C. Erickson, E.J. Kelly, G.J. Froelick, B.P. Zambrowicz, R.L. Brinster, R.D. Palmiter, *J. Neurosci.*, **1994**, 14, 5844.
- ¹⁰⁵ L. Liang, K. Fu, D.K. Lee, R.J. Sobieski, T. Dalton, G.K. Andrews, *Molecular Reproduction and Development*, **1996**, 43, 25.
- ¹⁰⁶ Y. Zhou, L. Li, B. Ru, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2000**, 1524, 87.
- ¹⁰⁷ C.G. Elinder, M. Nordberg, in *Cadmium and Health*, Vol. I, Ed. L. Friberg, C.-G. Elinder, T. Kjellström, G. F. Nordberg, CRC Press, Boca Raton, Fla, **1985**, 65.
- ¹⁰⁸ J.H. Kägi, S.R. Himmelhoch, P. D. Whanger, J.L. Bethune, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **1974**, 249, 3537.
- ¹⁰⁹ G. Öz, K. Zangger, I.M. Armitage, *Biochem.*, **2001**, 40, 11433.
- ¹¹⁰ M. Vašák, D.W. Hasler, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 4, 177.
- ¹¹¹ B. Roschitzki, M. Vašák, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2002**, 7, 611.
- ¹¹² J. Hidalgo, M. Aschner, P. Zatta, M. Vašák, *Brain Res. Bull.*, **2001**, 55, 133.
- ¹¹³ R. Bogumil, P. Faller, D.L. Pountney, M. Vašák, *Eur. J. Biochem.*, **1996**, 238, 698.
- ¹¹⁴ D.M. Durnam, R.D. Palmiter, *Experientia Suppl.*, **1987**, 52, 457.
- ¹¹⁵ M. Penkowa, M. Giral, J. Camats, J. Hidalgo, *J. Comp. Neurol.*, **2002**, 444, 174.
- ¹¹⁶ I. Bremner, *Experientia (suppl.)*, **1987**, 52, 81.
- ¹¹⁷ N.W. Shworak, O.C.TN.C. Wong, L. Gedamu, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 24460.
- ¹¹⁸ N. Cols, N. Romero-Isart, R. Bofill, M. Capdevila, P. González-Duarte, R. González-Duarte, S. Atrian, *Protein Eng.*, **1999**, 12, 265.
- ¹¹⁹ P. González-Duarte, "Metallothioneins". Dins: J.A. McCleverty, T.J. Meyer, (eds.). *Comprehensive Coordination Chemistry II*. Oxford: Elsevier, **2003**, 8(9), 213.
- ¹²⁰ M. Capdevila, N. Cols, N. Romero-Isart, R. González-Duarte, S. Atrian, P. González-Duarte, *Cell. Mol. Life Sci.*, **1997**, 53, 681.
- ¹²¹ N. Cols, N. Romero-Isart, M. Capdevila, B. Oliva, P. González-Duarte, R. González-Duarte, S. Atrian, *J. Inorg. Biochem.*, **1997**, 68, 157.
- ¹²² R. Bofill, M. Capdevila, N. Cols, S. Atrian, P. González-Duarte, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2001**, 6, 408.
- ¹²³ J.D. Otvos, I.M. Armitage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, 77, 7094.
- ¹²⁴ M. Vašák, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 3953.
- ¹²⁵ A. Arseniev, P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braun, G. Wagner, M. Vašák, J.H. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1988**, 201, 637.
- ¹²⁶ P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braun, G. Wagner, M. Vašák, J.H. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1988**, 203, 251.

- ¹²⁷ B.A. Messerle, M. Bos, A. Schäffer, M. Vašák, J.H. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1990**, 214, 781.
- ¹²⁸ K. Zangger, G. Oz, J.D. Otvos, I.M. Armitage, *Protein Sci.*, **1999**, 8, 2630.
- ¹²⁹ A.H. Robbins, D.E. McRee, M. Williamson, S.A. Collett, N.H. Xuong, W.F. Furey, B.C. Wang, C.D. Stout, *J. Mol. Biol.*, **1991**, 221, 1269.
- ¹³⁰ C.D. Berweger, W. Thiel, W.F. van Gunsteren, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **2000**, 41, 299.
- ¹³¹ M. Good, R. Hollenstein, M. Vašák, *Eur. J. Biochem.*, **1991**, 197, 655.
- ¹³² D.L. Pountney, M. Vašák, *Eur. J. Biochem.*, **1992**, 209, 335.
- ¹³³ K.S. Hagen, D.W. Stephan, R.H. Holm, *Inorg. Chem.*, **1982**, 21, 3928.
- ¹³⁴ M. Good, R. Hollenstein, P.J. Sadler, M. Vašák, *Biochem.*, **1988**, 27, 7163.
- ¹³⁵ A. Pattanaik, C.F. Shaw III, D.H. Petering, J. Garvey, A.J. Kraker, *J. Inorg. Biochem.*, **1994**, 54, 91.
- ¹³⁶ Y. Yang, W. Maret, B.L. Vallee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98, 5556.
- ¹³⁷ A. Krezel, Q. Hao, W. Maret, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2007**, 402, 551.
- ¹³⁸ W. Maret, B.L. Vallee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 3478.
- ¹³⁹ W. Maret, *Biochem.*, **2004**, 43, 3301.
- ¹⁴⁰ R.R. Misra, J.F. Hochadel, G.T. Smith, J.C. Cook, M.P. Waalkes, D.A. Wink, *Chem. Res. Toxicol.*, **1996**, 9, 326.
- ¹⁴¹ S.X. Liu, J.P. Fabisiak, V.A. Tyurin, G.G. Borisenko, B.R. Pitt, J.S. Lazo, V.E. Kagan, *Chem. Res. Toxicol.*, **2000**, 13, 922.
- ¹⁴² A. Bakka, A.S. Johnsen, L. Endresen, H.E. Rugstad, *Experientia*, **1982**, 38, 381.
- ¹⁴³ G.K. Andrews, *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, 59, 95.
- ¹⁴⁴ M. Sato, I. Bremner, *Free Radical Biology Medicine*, **1993**, 14, 325.
- ¹⁴⁵ L.B. Kohler, V. Berezin, E. Bock, M. Penkowa, *Brain Res.*, **2003**, 992, 128.
- ¹⁴⁶ H.L. Butcher, W.A. Kennette, O. Collins, R.K. Zalups, J. Koropatnick, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, 310, 589.
- ¹⁴⁷ X. Yang, T.A. Doser, C.X. Fang, J.M. Nunn, R. Janardhanan, M. Zhu, N. Sreejayan, M.T. Quinn, J. Ren, *FASEB J.*, **2006**, 20, 1024.
- ¹⁴⁸ F. Reinecke, O. Levanets, Y. Olivier, R. Louw, B. Semete, A. Grobler, J. Hidalgo, J. Smeitink, A. Olckers, F.H. Van der Westhuizen, *Biochem. J.*, **2006**, 395, 405.
- ¹⁴⁹ D.A. Wiseman, S.M. Wells, M. Hubbard, J.E. Welker, S.M. Black, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **2007**, 292, L165.
- ¹⁵⁰ Z. Peng, L. Peng, Y. Fan, E. Zandi, H.G. Shertzer, Y. Xia, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282(29), 21487.
- ¹⁵¹ M. Karin, R.J. Imbra, A. Heguy, G. Wong, *Mol. Cell Biol.*, **1985**, 5, 2866.
- ¹⁵² J.J. Schroeder, R.J. Cousins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87, 3137.
- ¹⁵³ M. Sato, M. Sasaki, H. Hojo, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **1992**, 75, 159.
- ¹⁵⁴ R.L. Friedman, G.R. Stark, *Nature*, **1985**, 314, 637.
- ¹⁵⁵ S.K. De, M.T. McMaster, G.K. Andrews, *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 15267.
- ¹⁵⁶ J. Youn, L.A. Borghesi, E.A. Olson, M.A. Lynes, *J. Toxicol. Environ. Health*, **1995**, 45, 397.
- ¹⁵⁷ L.A. Borghesi, J. Youn, E. A. Olson, M.A. Lynes, *Toxicology*, **1996**, 108, 129.
- ¹⁵⁸ J.S. Garvey, *Environ. Health Perspect.*, **1984**, 117.
- ¹⁵⁹ I. Bremner, J.N. Morrison, A.M. Wood, J.R. Arthur, *J. Nutr.*, **1987**, 117, 1595.
- ¹⁶⁰ J. Hidalgo, M. Giralt, J. S. Garvey, A. Armario, *Am. J. Physiol.*, **1988**, 254, E71.
- ¹⁶¹ P. Trayhurn, J. S. Duncan, A. M. Wood, J. H. Beattie, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2000**, 279, R2329.
- ¹⁶² R.S. Chung, J.C. Vickers, M.I. Chuah, A.K. West, *J. Neurosci.*, **2003**, 23, 3336.
- ¹⁶³ M. Vašák, G. Meloni, *Met. Ions Life Sci.* **2009**, 5, 319.
- ¹⁶⁴ Y. Uchida, in *Metallothionein III. Biological Roles and Medical Implication*, Ed.K. T. Suzuki, M. Imura, M. Kimura, ALS Advances in Life Sciences, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, **1993**, 315.
- ¹⁶⁵ M.G. Cherian, *Environ. Health Perspect.*, **1994**, 102 (suppl. 3), 131.
- ¹⁶⁶ M. Aschner, M.G. Cherian, C.D. Klaassen, R.D. Palmiter, J.C. Erickson and A.I. Bush, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1997**, 142, 229.
- ¹⁶⁷ E. Artells, Ó. Palacios, M. Capdevila, S. Atrian, *Biochem J.*, **2013** submitted (“Biologically relevant metal-complexes of MT3, the brain specific mammalian metallothionein”)

- 168 R. Bogumil, P. Faller, P.A. Binz, M. Vašák, J.M. Charnock, C.D. Garner, *Eur. J. Biochem.*, **1998**, 255, 172.
- 169 P. Faller, M. Vašák, *Biochem.*, **1997**, 36, 13341.
- 170 D.W. Hasler, P. Faller, M. Vašák, *Biochem.*, **1998**, 37, 14966.
- 171 H. Wang, Q. Zhang, B. Cai, H. Li, K.H. Sze, Z.X. Huang, H.M. Wu, H. Sun, *FEBS Lett.*, **2006**, 580, 795.
- 172 P. Faller, D.W. Hasler, O. Zerbe, S. Klauser, D.R. Winge, M. Vašák, *Biochem.*, **1999**, 38, 10158.
- 173 N. Romero-Isart, L.T. Jensen, O. Zerbe, D.R. Winge, M. Vašák, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 37023.
- 174 A.K. Sewell, L.T. Jensen, J.C. Erickson, R.D. Palmiter, D.R. Winge, *Biochem.*, **1995**, 34, 4740.
- 175 D.W. Hasler, L.T. Jensen, O. Zerbe, D.R. Winge, M. Vašák, *Biochem.*, **2000**, 39, 14567.
- 176 B. A. Messerle, A. Schaffer, M. Vašák, J. H. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **1990**, 214, 765.
- 177 P. Palumaa, E. Eriste, O. Njankova, L. Pokras, H. Jornvall, R. Sillard, *Biochem.*, **2002**, 41, 6158.
- 178 P. Palumaa, I. Tammiste, K. Kruusel, L. Kangur, H. Jornvall, R. Sillard, *Biochim. Biophys. Acta*, **2005**, 1747, 205.
- 179 D.L. Pountney, I. Schauwecker, J. Zarn, M. Vašák, *Biochem.*, **1994**, 33, 9699.
- 180 B. Dolderer, H. Echner, A. Beck, H.J. Hartmann, U. Weser, C. Luchinat, C. Del Bianco, *FEBS J.*, **2007**, 274, 2349.
- 181 K.B. Nielson, D.R. Winge, *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259, 4941.
- 182 K.B. Nielson, D.R. Winge, *J. Biol. Chem.*, **1983**, 258, 13063.
- 183 S. Toriumi, T. Saito, T. Hosokawa, Y. Takahashi, T. Numata, M. Kurasaki, *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2005**, 96, 295.
- 184 Q. Zheng, W.M. Yang, W.H. Yu, B. Cai, X.C. Teng, Y. Xie, H.Z. Sun, M.J. Zhang, Z.X. Huang, *Protein. Eng.*, **2003**, 16, 865.
- 185 G. Meloni, P. Faller, M. Vašák, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 16068.
- 186 Y. Chen, Y. Irie, W.M. Keung, W. Maret, *Biochem.*, **2002**, 41, 8360.
- 187 Y. Uchida, F. Gomi, T. Masumizu, Y. Miura, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 32353.
- 188 B. Roschitzki, M. Vašák, *Biochem.*, **2003**, 42, 9822.
- 189 C.J. Quaipe, E.J. Kelly, B.A. Masters, R.L. Brinster, R.D. Palmiter, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1998**, 148, 148.
- 190 M. Penkowa, L. Tio, M. Giral, A. Quintana, A. Molinero, S. Atrian, M. Vašák, J. Hidalgo, *J. Neurosci. Res.*, **2006**, 83, 974.
- 191 J.C. Erickson, G. Hollopeter, S.A. Thomas, G.J. Froelick, R.D. Palmiter, *J. Neurosci.*, **1997**, 17, 1271.
- 192 Y. Irie, W.M. Keung, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, 282, 416.
- 193 Y. Uchida, *J. Neurochem.*, **1999**, 73, 1945.
- 194 L. Villarreal, *Tesis Doctoral*, Dept. Química, Universidad Autónoma de Barcelona, **2004**.
- 195 T. Schlake, T. Boehm, *Mech. Dev.*, **2001**, 109, 419.
- 196 L. Tio, L. Villarreal, S. Atrian, M. Capdevila, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 24403.
- 197 K. Polec, Ò. Palacios, M. Capdevila, P. González-Duarte, R. Lobinski, *Talanta*, **2002**, 57(5), 1011.
- 198 J. A. Barnett, R. W. Payne, D. Yarrow. *Yeasts: characterization and identification*, **1990**, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- 199 D. J. Thiele, *Mol. Cell. Biol.*, **1988**, 8, 2745.
- 200 D. J. Thiele, D. H. Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, **1986**, 6, 1158.
- 201 E. B. Gralla, D. J. Thiele, P. Silar, J. S. Valentine, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, **1991**, 88, 8558.
- 202 V. C. Culotta, W. R. Howard, X. F. Liu, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 25295.
- 203 M.M. Pena, K.A. Koch, D.J. Thiele, *Mol. Cell Biol.*, **1998**, 18, 2514.
- 204 L.T. Jensen, W.R. Howard, J.J. Strain, D.R. Winge, V.C. Culotta, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 18514.
- 205 A. Pagani, L. Villarreal, M. Capdevila, S. Atrian, *Mol. Microbiol.*, **2007**, 63(1), 256.
- 206 D.R. Winge, K.B. Nielson, W.R. Gray, D.H. Hamer, *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 14464.
- 207 T.R. Butt, E.J. Sternberg, J.A. Gorman, P. Clark, D. Hamer, M. Rosenberg, S.T. Crooke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, 81, 3332.
- 208 R. Prinz, U. Weser, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1975**.

- ²⁰⁹ C. Luchinat, B. Dolderer, C. Del Bianco, H. Echner, H.J. Hartmann, W. Voelter, U. Weser, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2003**, 8, 353.
- ²¹⁰ J.M. Christensen, J. Kristiansen, en *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*, H.G. Seiler, A. Sigel, H. Sigel, Eds., Marcel Dekker, New York, **1994**, 440.
- ²¹¹ F.A. Cotton, G. Wilkinson, C.A. Murillo, M. Bochmann, *Advanced Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1999**.
- ²¹² T.G. Spiro, W.M. Stigliani, *Chemistry of the Environment*, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, **1996**.
- ²¹³ E.S. Claudio, H.A. Godwin, J.S. Magyar, *Prog. Inorg. Chem.*, **2003**, 51, 1.
- ²¹⁴ P. Tsai, R.P. Cooney, *J. Chem Soc. Dalton*, **1976**, 1631.
- ²¹⁵ L. Shimoni-Livny, J.P. Glusker, C.W. Bock, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 1853.
- ²¹⁶ R.G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 3533.
- ²¹⁷ C.E. Holloway, M. Melnik, *Main Group Metal Chem.*, **1997**, 20, 399.
- ²¹⁸ La búsqueda de compuestos no iónicos y no poliméricos que contengan Pb con un factor-R \leq 0.05 y sin desorden ni error se realizó en la base de datos del CSD, versión de julio 2013, utilizando el software Windows Conquest 1.14. El criterio de distancia de Pb-átomo dador fue de 0-3.5 Å. De una segunda selección de los compuestos encontrados se extrajeron un total de 540 compuestos de Pb(II). Para Pb(IV) se encontraron sólo 44 compuestos.
- ²¹⁹ P. Pyykko, *Chem. Rev.*, **1988**, 88, 563.
- ²²⁰ I. Casals, Tesis Doctoral, U.A.B., Fàc. Ciències, **1991**.
- ²²¹ M. Capdevila, Tesis Doctoral, U.A.B., Fàc. Ciències, **1993**.
- ²²² M. Muller, R.J.H. Clark, R.S. Nyholm, *Transition Met. Chem.*, **1978**, 3, 369.
- ²²³ P.A.W. Dean, J.J. Vittal, N.C. Payne, *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 4232.
- ²²⁴ E.W. Abel, D.A. Armitage, *Adv. Organomet. Chem.*, **1967**, 5, 1.
- ²²⁵ B.M. Bridgewater, G. Parkin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 7140.
- ²²⁶ R.L. Davidovich, V. Stavila, K.H. Whitmire, *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, 254, 2193.
- ²²⁷ H. Needleman, *Annu. Rev. Med.*, **2004**, 55(1), 209.
- ²²⁸ A.A. Jarzęcki, *Inorg. Chem.*, **2007**, 46(18), 7509.
- ²²⁹ E.I. Voit, R.L. Davidovich, *J. Struct. Chem.*, **2012**, 53(2), 228.
- ²³⁰ C. Gourlaouen, O. Parisel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 553.
- ²³¹ C.P. Iglesias, D.E. Gomez, T.E. Perez, et al, *Inorg. Chem.*, **2005**, 44(7), 2224.
- ²³² H. Fleischer, D. Schollmeyer, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43(18), 5529.
- ²³³ J.C. Payne, M.A. ter Horst, H.A. Godwin, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6850.
- ²³⁴ B. Wrackmeyer, K. Horchler, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, **1990**, 22, 249.
- ²³⁵ R.J. Andersen, R.C. diTargiani, R.D. Hancock, C.L. Stern, D.P. Goldberg, H.A. Godwin, *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, 6574.
- ²³⁶ E.S. Claudio, M.A. ter Horst, C.E. Forde, C.L. Stern, M.K. Zart, H.A. Godwin, *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 1391.
- ²³⁷ S. Rupperecht, S. J. Franklin, K. N. Raymond, *Inorg. Chim. Acta*, **1995**, 235, 185.
- ²³⁸ J.M. Aramini, T. Hiraoki, M. Yazawa, T. Yuan, M.J. Zhang, H.J. Vogel, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, 1, 39.
- ²³⁹ S. Rupperecht, K. Langemann, T. Lugger, J.M. McCormick, K.N. Raymond, *Inorg. Chim. Acta*, **1996**, 243, 79.
- ²⁴⁰ R. Pedrido, M.R. Bermejo, M.J. Romero, M. Vazquez, A.M. Gonzalez-Noya, M. Maneiro, M.J. Rodriguez, M. I. Fernandez, *Dalton Trans.* **2005**, 572.
- ²⁴¹ D.L. Reger, Y. Ding, A.L. Rheingold, R.L. Ostrander, *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 4226.
- ²⁴² K.P. Neupane, V.L. Pecoraro, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 8177.
- ²⁴³ K.P. Neupane, V.L. Pecoraro, *J. Inorg. Biochem.*, **2011**; 105(8), 1030.
- ²⁴⁴ E.K. Silbergeld, *Mutat. Res.*, **2003**, 533, 121.
- ²⁴⁵ S. Coon, A. Stark, E. Peterson, A. Gloi, G. Kortsha, J. Pounds, D. Chettle, J. Gorell, *Environ. Health Perspect.*, **2006**, 114, 1872.
- ²⁴⁶ IARC (*International Agency for Research on Cancer*). (**2006**). Inorganic and organic lead compounds. Williams, R., Ed. **2006**. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Vol. 87, pp. 1-471. WHO Press, Lyon, France
- ²⁴⁷ C.D. Toscano, T.R. Guilarte, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **2005**, 49, 529.
- ²⁴⁸ L.D. White, D.A. Cory-Slechta, M.E. Gilbert, E. Tiffany-Castiglioni, N.H. Zawia, M. Virgolini, A. Rossi-George, S.M. Lasley, Y.C. Qian, M.R. Basha, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2007**, 225, 1.

- 249 J. Wu, M.R. Basha, B. Brock, D.P. Cox, F. Cardozo-Pelaez, C.A. McPherson, J. Harry, D.C. Rice, B. Maloney, D. Chen, et al., *J. Neurosci.*, **2008**, 28, 3.
- 250 B.P. Lanphear, *Science*, **1998**, 281, 1617.
- 251 Y. Finkelstein, M.E. Markowitz, J.F. Rosen, *Brain Res Brain Res Revs*, **1998**, 27, 168.
- 252 P. Zuo, W. Qu, R.N. Cooper, R.A. Goyer, B.A. Diwan, M.P. Waalkes, *Toxicological Sciences*, **2009**, 111(1), 100.
- 253 C.V. Nolan, Z.A. Shaikh, *Toxicology*, **1992**, 73, 127.
- 254 R.A. Goyer, B.C. Rhyne, *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **1973**, 12, 1.
- 255 E. Klann, K.R. Shelton, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 16969.
- 256 S.S. Blackman Jr, *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*, **1936**, 58, 384.
- 257 W. Qu, B.A. Diwan, J. Liu, R.A. Goyer, T. Dawson, J.L. Horton, M.G. Cherian, M.P. Waalkes, *Am. J. Pathol.*, **2002**, 160, 1047.
- 258 M.P. Waalkes, J. Liu, R.A. Goyer, B.A. Diwan, *Cancer Res.*, **2004**, 64, 7766.
- 259 B.A. Fowler, *Environ. Health Perspect.*, **1998**, 106, 1585.
- 260 D.R. Smith, M.W. Kahng, B. Quintanilla-Vega, B.A. Fowler, *Chemico-Biological Interactions*, **1998**, 115(1), 39.
- 261 B. Quintanilla-Vega, D.R. Smith, M.W. Kahng, J.M. Hernandez, A. Albores, B.A. Fowler, *Chemico-Biological Interactions*, **1995**, 98(3), 193.
- 262 S.R.V. Raghavan, H.C. Gonick, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **1977**, 155(2), 164.
- 263 M.J. Warren, J.B. Cooper, S.P. Wood, P.M. Shoolingin-Jordan, *Trends Biochem. Sci.*, **1998**, 23(6), 217.
- 264 E. Sabbioni, E. Marafante, *Chemico-Biological Interactions*, **1976**, 15(1), 1.
- 265 H. Ikebuchi, R. Teshima, K. Suzuki, *Biochemical Journal*, **1986**, 233(2), 541.
- 266 J. Singh, D.E. Pritchard, D.L. Carlisle et al., *Toxicology and Applied Pharmacology*, **1999**, 161(3), 240.
- 267 C.S. Fullmer, S. Edelstein, R.H. Wasserman, *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260(11), 6816.
- 268 H.C. Gonick, *J. Toxicol.*, **2011**, 2011, 686050.
- 269 E.J. Baran, *Química Bioinorgánica*, **1995**, 235.
- 270 P.L. Goering, *Neurotoxicology*, **1993**, 14, 45.
- 271 M.P. Waalkes, M.J. Harvey, C.D. Klaassen, *Toxicol. Lett.* **1984**, 20, 33.
- 272 C.D. Klaassen, J. Liu, S. Choudhuri, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1999**, 39, 267.
- 273 T.J.B. Simons, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 234, 178.
- 274 N.H. Zawia, T. Crumpton, M. Brydie, G.R. Reddy, M. Razmiafshari, *Neurotoxicol.*, **2000**, 21, 1069.
- 275 J.S. Hanas, J.S. Rodgers, J.A. Bantle, Y.G. Cheng, *Mol. Pharmacol.*, **1999**, 56, 982.
- 276 T.J.B. Simons, *Neurotoxicol.*, **1994**, 14, 77.
- 277 E. Habermann, K. Crowell, P. Janicki, *Arch Toxicol.*, **1983**, 54, 61.
- 278 G.W. Goldstein, *D. Ar. Life Sci.*, **1983**, 33, 1001.
- 279 C. Bouton, L.P. Frelin, C.E. Forde, H.A. Godwin, J. Pevsner, *J. Neurochem.*, **2001**, 76, 1724.
- 280 J. Markovac, G.W. Goldstein, *Nature*, **1988**, 334, 71.
- 281 R.B. Sutton, B.A. Davletov, A.M. Berghuis, T.C. Sudhof, S.R. Sprang, *Cell*, **1995**, 80, 929.
- 282 R.B. Sutton, J.A. Ernst, A.T. Brunger, *J. Cell. Biol.*, **1999**, 147, 589.
- 283 H.A. Godwin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 223.
- 284 J.E. Coleman, *Annu. Rev. Biochem.*, **1992**; 61, 897.
- 285 A.B. Ghering, L.M. Miller, B.L. Schenck, S. Deo, R.A. Mayer, M.J. Pikaart, J.G. Omichinski, H.A. Godwin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3751.
- 286 J.S. Magyar, T.-C. Weng, C.M. Stern, D.F. Dye, B.W. Rous, J.C. Payne, B.M. Bridgewater, A. Mijovilovich, G. Parkin, J.M. Zaleski, J.E. Penner-Hahn, H.A. Godwin *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127 (26), 9495.
- 287 A.J. Dent, D. Beyersmann, C. Block, S.S. Hasnain, *Biochem.*, **1990**, 29, 7822.
- 288 E.K. Jaffe, M. Volin, C.B. Myers, W.R. Abrams, *Biochem.*, **1994**, 33, 11554.
- 289 P.T. Erskine, N. Senior, S. Awan, R. Lambert, G. Lewis, I.J. Tickle, M. Sarwar, P. Spencer, P. Thomas, M.J. Warren, P.M. Shoolingin-Jordan, S.P. Wood, J.B. Cooper., *Nat. Struct. Biol.*, **1997**, 4, 1025.
- 290 P.T. Erskine, E. Norton, J.B. Cooper, R. Lambert, A. Coker, G. Lewis, P. Spencer, M. Sarwar, S.P. Wood, M.J. Warren, P.M. Shoolingin-Jordan, *Biochem.*, **1999**, 38, 4266.
- 291 E.K. Jaffe, J. Martins, J. Li, J. Kervinen, R.L. Dunbrack, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 1531.

- 292 T.J.B. Simons, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 32, 3052.
- 293 P. Spencer, P.M. Jordan, *Biochem. J.*, **1994**, 300, 373.
- 294 A.B. Ghering, J.E. Shokes, R.A. Scott, J.G. Omichinski, H.A. Godwin, *Biochem.*, **2004**, 43, 8346.
- 295 T. Crumpton, D.S. Atkins, N.H. Zawia, S. Barone, *J. NeuroToxicol.*, **2001**, 22, 49.
- 296 M. Razmiafshari, N.H. Zawia, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2000**, 166, 1.
- 297 N.H. Zawia, R. Sharan, M. Brydie, T. Oyama, T. Crumpton, *Dev. Brain Res.* **1999**, 107, 291.
- 298 M. Huang, D. Krepiy, W. Hu, D.H. Petering. *J. Inorg. Biochem.*, **2004**; 98, 775.
- 299 A. Hartwig, *Antioxid. Redox Signal*, **2001**, 3, 625.
- 300 I.M. Klotz, J.M. Urquhart, H.A. Fiess, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 5537.
- 301 J.J.I. Arsenault, P.A.W. Dean, *Can. J. Chem.*, **1983**, 61, 1516.
- 302 G. Christou, K. Folting, J.C. Huffman, *Polyhedron*, **1984**, 3, 1247.
- 303 P.R. Chen, E.C. Wasinger, J. Zhao, D. Van der Lelie, L.X. Chen, C. He, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 12350.
- 304 P.R. Chen, C. He, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2008**, 12, 214.
- 305 N.L. Brown, J.V. Stoyanov, S.P. Kidd, J.L. Hobman, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2003**, 27, 145.
- 306 T. O'Halloran, C. Walsh, *Science* **1987**, 235, 211.
- 307 P.R. Chen, B. Greenberg, S. Taghavi, C. Romano, D. Van der Lelie, C. He, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 2715.
- 308 J.L. Hobman, *Mol. Microbiol*, **2007**, 63, 1275.
- 309 B. Borremans, J.L. Hobman, A. Provoost, N.L. Brown, D. Van der Lelie, *J. Bacteriol.*, **2001**, 183, 5651.
- 310 M. Matzapetakis, D. Ghosh, T.C. Weng, J.E. Penner-Hahn, V.L. Pecoraro, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2006**, 11, 876.
- 311 W. Shi, J. Wu, B.P. Rosen, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 19826.
- 312 L.S. Busenlehner, M.A. Pennella, D.P. Giedroc, *FEMS Microbiol Rev.*, **2003**, 27, 131.
- 313 Y. Sun, M.D. Wong, B.P. Rosen, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 14955.
- 314 M.D. Wong, Y.F. Lin, B.P. Rosen, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 40930.
- 314 Y. Sun, M.D. Wong, B.P. Rosen, *Mol. Microbiol.*, **2002**, 44, 1323.
- 315 L.S. Busenlehner, T.C. Weng, J.E. Penner-Hahn, D.P. Giedroc, *J. Mol. Biol.* **2002**, 319, 685.
- 316 J.L. Apuy, L.S. Busenlehner, D.H. Russell, D.P. Giedroc, *Biochem.*, **2004**, 43, 3824.
- 317 B. Quintanilla-Vega, D.J. Hoover, W. Bal, E.K. Silbergeld, M.P. Waalkes, L.D. Anderson, *Chem Res Toxicol.*, **2000**, 13, 594.
- 318 D.J. McKay, B.S. Renaux, G.H. Dixon, *Eur. J. Biochem.*, **1986**, 156, 5.
- 319 H. Ammer, A. Henschen, C.H. Lee, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **1986**, 367, 515.
- 320 R.S. Brown, B.E. Hingerty, J.C. Dewan, A. Klug, *Nature*, **1983**, 303, 543.
- 321 B.L. Vallee, D.D. Ulmer, *Annu. Rev. Biochem.*, **1972**, 41, 91.
- 322 B. Quintanilla-Vega, D.R. Smith, M.W. Kahng, J.M. Hernández, A. Albores, B.A. Fowler, *Chem. Biol. Interact.*, **1995**, 98, 193.
- 323 F.M. Johnson, *Mutat. Res.*, **1998**, 410, 123.
- 324 E.A. El-Zohairy, A.F. Youssef, S.M. Abul-Nasr, I.M. Fahmy, D. Salem, A.K. Kahl, M.K. Madkour, *Reprod. Toxicol.*, **1996**, 2, 145.
- 325 T.G. Robins, *Am. J. Ind. Health*, **1997**, 32, 369.
- 326 C. Sen, *J. Nutr. Biochem.*, **1997**; 8, 660.
- 327 L. Kromidas, L.D. Trombetta, I.S. Jamall, *Toxicol. Lett.*, **1990**, 51, 67.
- 328 V. Mah, *PhD thesis*. Alberta: University of Calgary, **2009**, 185.
- 329 K. Polec-Pawlak, R. Ruzika, E. Lipiec, *Talanta*, **2007**; 72, 1564.
- 330 R.K. Mehra, V.R. Kodati, R. Abdullah, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, 215, 730.
- 331 W. Bae, R.K. Mehra, *J. Inorg. Biochem.*, **1997**; 68, 201.
- 332 W. Bernhard, M. Good, M. Vašák, J.H.R. Kági, *Inorg. Chim. Acta*, **1983**, 79, 154.
- 333 J.M. Charnock, C.D. Garner, I.L. Abrahams, J.M. Arber, S.S. Hasnain, C. Henehan, M. Vašák, *Physica B*, **1989**, 158, 93.
- 334 W. Cai, M.J. Stillman, *Inorg. Chim. Acta*, **1988**, 152, 111.
- 335 À. Leiva-Presa, *Tesis Doctoral*, Dept. Química, Universidad Autónoma de Barcelona, **2001**.
- 336 W.G. He, D.Y. Chu, J.Y. Yang, D.F. Yao, M.C. Shao, *Chin. Chem. Lett.*, **1999**, 10, 87.
- 337 D. Chu, Y. Tang, Y. Huan, W. He, W. Cao, *Thermochimica Acta*, **2000**, 352(3), 205.
- 338 D. Chu, Y. Tang, Y. Huan, W. He, W. Cao, *Thermochim. Acta*, **2002**, 36, 503.
- 339 Q. Ji, L. Wang, B. Ru, *Chin. J. Biochem. Molec. Biol.*, **1999**, 15, 928.

-
- ³⁴⁰ Q. Ji, L. Wang, Y. Zhou, B. Ru, *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, **2000**, 36, 503.
- ³⁴¹ X. Wei, B. Ru, *Chin. J. Biochem. Molec. Biol.*, **1999**, 15, 289.
- ³⁴² Q. Ji, L. Wang, Y. Zhou, B. Ru, *Beijing Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, **2002**, 36, 503.
- ³⁴³ X. Li, S. Hao, Y. Liu, B. Ru, *Weisheng Yanjiu*, **2001**, 30, 198.
- ³⁴⁴ Ó. Palacios, M. Capdevila, *Encyclopedia of metalloproteins (Edited by R.H. Kretsinger, V.N. Uversky & E.A. Permyakov)*, **2013**, 1383.
- ³⁴⁵ M.J. Stillman, A.J. Zelazowski, *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 6128.
- ³⁴⁶ R. DeBusk et al., "*Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)*", **2002**.
- ³⁴⁷ F.A. Cotton, *Chemical Applications of Group Theory*, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1990**.
- ³⁴⁸ M. E. Mortensen, P. D. Walson, *Clinical Pediatrics*, **1993**, 284.
- ³⁴⁹ A. F. Holleman, E. Wiberg, *Inorganic Chemistry*, San Diego: Academic Press., **2001**.
- ³⁵⁰ P. W. Atkins, L. Jones, *Principios de la Química. Los caminos del descubrimiento*, Ed. Médica Panamericana, **2012**, 354.