

Universidad de Huelva

Departamento de Química "Profesor José Carlos Vílchez
Martín"



**Estudio metalo-metabólico de bioindicadores de áreas
costeras y estuarinas del suroeste de la Península Ibérica**

**Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:**

Amanda Gago Tinoco

Fecha de lectura: 13 de enero de 2016

Bajo la dirección de los doctores:

José Luis Gómez Ariza

Tamara García Barrera

Julián Blasco Moreno

Huelva, 2016



UNIVERSIDAD DE HUELVA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Departamento de Química y Ciencia de los Materiales

“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”



**ESTUDIO METALO-METABOLÓMICO DE BIOINDICADORES
DE ÁREAS COSTERAS Y ESTUARINAS DEL SUROESTE DE LA
PENÍNSULA IBÉRICA**

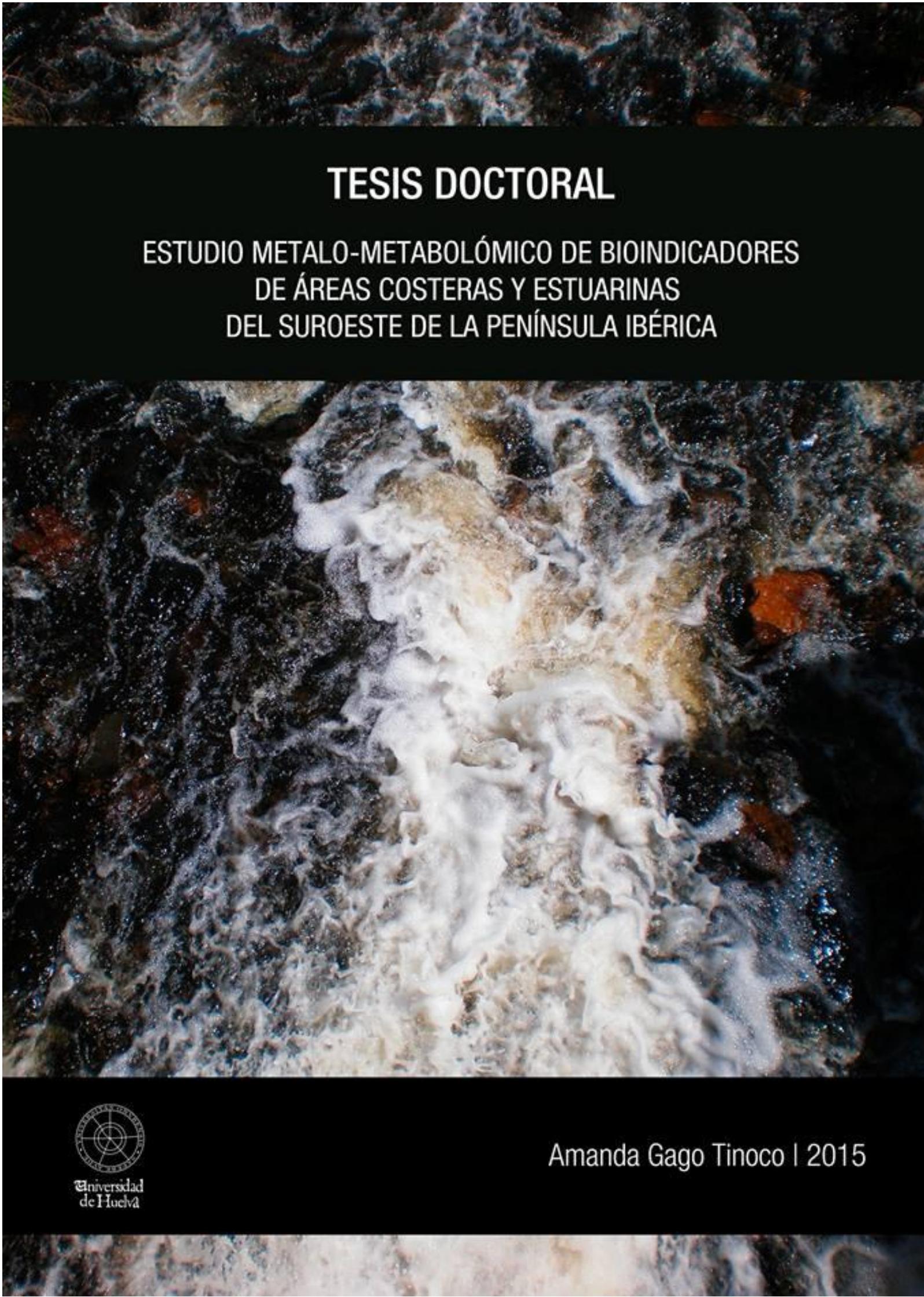
**Memoria para optar al
grado de doctor presentada por:**

Amanda Gago Tinoco

Bajo la dirección de los doctores:

Jose Luís Gómez Ariza
Tamara García Barrera
Julián Blasco Moreno

Huelva, 2015



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO METALO-METABOLÓMICO DE BIOINDICADORES
DE ÁREAS COSTERAS Y ESTUARINAS
DEL SUROESTE DE LA PENÍNSULA IBÉRICA



Universidad
de Huelva

Amanda Gago Tinoco | 2015

UNIVERSIDAD DE HUELVA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Departamento de Química y Ciencia de los Materiales

“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”



**ESTUDIO METALO-METABOLÓMICO DE BIOINDICADORES
DE ÁREAS COSTERAS Y ESTUARINAS DEL SUROESTE DE LA
PENÍNSULA IBÉRICA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO:
TÉCNICAS INSTRUMENTALES EN QUÍMICA**

**Memoria para optar al
grado de doctor presentada por:**

Amanda Gago Tinoco

Bajo la dirección de los doctores:

Jose Luís Gómez Ariza

Tamara García Barrera

Julián Blasco Moreno

Huelva, 2015

**ESTUDIO METALO-METABOLÓMICO DE
BIOINDICADORES DE ÁREAS COSTERAS Y
ESTUARINAS DEL SUROESTE DE LA PENÍNSULA
IBÉRICA**

Directores:



Fdo. *Jose Luís Gómez Ariza*
Catedrático de Universidad

Fdo. *Tamara García Barrera*
Profesora Titular de Universidad

Fdo. *Julián Blasco Moreno*
Investigador Científico del
CSIC



**UNIVERSIDAD DE HUELVA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y
CIENCIA DE LOS MATERIALES
“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”**

Trabajo presentado para optar al Grado de Doctor por:

Fdo. *Amanda Gago Tinoco*

Licenciada en Biología

D. JOSE LUÍS GÓMEZ ARIZA, Catedrático de Universidad y director del Departamento de Química y Ciencia de los Materiales “Profesor José Carlos Vílchez Martín” de la Universidad de Huelva

HACE CONSTAR QUE:

El presente trabajo de investigación, titulado “ESTUDIO METALOMETABOLÓMICO DE BIOINDICADORES DE ÁREAS COSTERAS Y ESTUARINAS DEL SUROESTE DE LA PENÍNSULA IBÉRICA”, realizado por Dña. Amanda Gago Tinoco, bajo la dirección del Prof. José Luis Gómez Ariza, la Prof. Tamara García Barrera y Julián Blasco Moreno, reúne los requisitos necesarios para ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Química y Ciencia de los Materiales “Prof. J. C. Vílchez Martín” de la Universidad de Huelva.

Huelva, 16 de Noviembre de 2015

Fdo. Jose Luís Gómez Ariza

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a mis Directores de Tesis, Jose Luís Gómez Ariza, Tamara García Barrera, y Julián Blasco Moreno; por todo el tiempo y esfuerzo dedicado. A Jose Luís y Tamara por acogerme dentro del grupo de investigación “Análisis Medioambiental y Bioanálisis”, así como por concederme la oportunidad de desarrollar, además de esta Tesis Doctoral, proyectos que han sido muy relevantes para el desarrollo de mi trayectoria profesional; y a Julián y a su grupo de investigación del Departamento de “Ecología y Gestión Costera” (ICMAN-CSIC) de Puerto Real (Cádiz), por compartir su experiencia conmigo, así como por suministrarme material para los estudios abordados en la Tesis.

Agradecer al grupo de investigación del Centro de Investigación Marina y Ambiental (CIMA) de la Universidad de Algarve (Faro), y en concreto a la Dra. María Joao Bebianno, por otorgarme su ayuda durante mi estancia de dos semanas en el centro.

Y como no agradecer a todos mis compañeros-amigos de laboratorio con los que he compartido tantas horas y risas estos años; que me han “soportado” y han tenido una paciencia infinita; lo que hace que a día de hoy los recuerde y los tenga en estima.

Además, a mis amigos de toda la vida y a los nuevos, que han tenido que escuchar mis charlas científicas y a su vez han ofrecido su cariño y apoyo, repitiéndome constantemente “TU PUEDES CON TODO”.

Por último, y lo más importante, a los que nunca han dudado de mí, que me han ofrecido su apoyo incondicional y que a día de hoy son lo más bonito que tengo, a mis padres.

A mi familia y amigos

“La ciencia no es sino una perversión de sí misma a menos que tenga como objetivo final el mejoramiento de la humanidad”

Nikola Tesla

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMEN	vii
OBJETIVOS	xi
INTRODUCCIÓN	1
1. LA PROBLEMÁTICA DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y SU DIAGNOSIS . 3	
1.1. Los metales en el medioambiente: esencialidad y toxicidad.....	6
1.2. Los fármacos en el medioambiente	9
1.3. Monitoreo y diagnóstico medioambiental	12
2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS MASIVO: METALÓMICA Y METABOLÓMICA MEDIOAMBIENTAL	14
2.1. Metalómica.....	16
3. BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN SISTEMAS ACUÁTICOS	25
LOS MOLUSCOS BIVALVOS	27
LOS CRUSTÁCEOS	28
3.1. <i>Scrobicularia plana</i> como bioindicador.....	29
3.2. <i>Ruditapes philippinarum</i> como bioindicador	30
3.3. <i>Procambarus clarkii</i> como bioindicador.....	31
4. BIOMARCADORES	35
4.1 Concepto de biomarcador.....	35
4.2. Enzimas de biotransformación como biomarcadores.....	38
4.3. Estrés oxidativo: Biomarcadores de daño oxidativo	41
4.4. Metales más relevantes en metaloproteínas de interés ambiental	44
4.5. Biomarcadores convencionales: La metalotioneína y la peroxidación lipídica	48
5. ÁREAS DE INTERÉS AMBIENTAL DEL SUROESTE DE LA PENÍNSULA IBÉRICA	50
5.1. Marismas y ecosistemas acuáticos de la región transfronteriza de España y Portugal	50
5.2. Parque Nacional de Doñana y su entorno	53
6. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA A LA CONTAMINACIÓN	56
6.1. Metalómica.....	56
6.2. Metabolómica.....	63
BIBLIOGRAFÍA	77
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	103

CAPÍTULO 1: Estudio de la respuesta biológica del molusco bivalvo <i>Scrobicularia plana</i> al estrés medioambiental utilizando un enfoque metalómico	107
I. ANTECEDENTES	109
II. PARTE EXPERIMENTAL.....	113
2.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA.....	115
2.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES PATRÓN.....	117
2.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	118
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	125
3.1. CONCENTRACIÓN DE METALES TOTALES EN LOS EXTRACTOS DE GLÁNDULA DIGESTIVA	127
3.2. PERFILES DE BIOMOLÉCULAS UNIDAS A METALES EN LOS EXTRACTOS DE GLÁNDULA DIGESTIVA	130
IV. CONCLUSIONES	133
V. BIBLIOGRAFÍA.....	137
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	141

CAPÍTULO 2: Evaluación de la respuesta biológica del cangrejo <i>Procambarus clarkii</i> sometido a estrés medioambiental mediante biomarcadores convencionales y metalómica	145
I. ANTECEDENTES	147
II. PARTE EXPERIMENTAL.....	149
2.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA.....	151
2.2- REACTIVOS Y DISOLUCIONES PATRÓN	152
2.3- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	154
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	161
3.1- CONCENTRACIÓN DE METALES TOTALES EN GLÁNDULA DIGESTIVA, BRANQUIAS Y MÚSCULO DE <i>P. CLARKII</i>	163
3.2. BIOMARCADORES EN GLÁNDULA DIGESTIVA DE <i>P. clarkii</i> . METALOTIONEÍNA Y LPO.....	164
3.3. PERFILES DE BIOMOLÉCULAS UNIDAS A Cu, Zn Y As EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE GLÁNDULA DIGESTIVA, MÚSCULO Y BRANQUIAS DE <i>P. Clarkii</i>	166
3.4. ESPECIACIÓN DE As EN GLÁNDULA DIGESTIVA DE <i>P. Clarkii</i> EN ÁREAS CONTAMINADAS Y NO CONTAMINADAS	169
IV. CONCLUSIONES	171
V. BIBLIOGRAFÍA.....	175
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	181

CAPÍTULO 3: Búsqueda de biomarcadores metabólicos de estrés medioambiental en el cangrejo <i>Procambarus clarkii</i>	185
I. ANTECEDENTES	187
II. PARTE EXPERIMENTAL.....	189
2.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA.....	191
2.2. REACTIVOS	191
2.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	191
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	195
3.1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR METALES	197
3.2. COMPARACIÓN DE LOS PERFILES METABOLÓMICOS	197
3.3. DISCUSIÓN.....	200
IV. CONCLUSIONES	205
V. BIBLIOGRAFÍA.....	209
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS.....	213
CAPÍTULO 4: Búsqueda de biomarcadores metabólicos en <i>Ruditapes philippinarum</i> sometido a experiencias de exposición a fármacos	217
I. ANTECEDENTES	219
1.1- ENSAYOS DE LABORATORIO Y DE CAMPO.....	219
OBJETIVO.....	224
II. PARTE EXPERIMENTAL.....	225
2.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA.....	227
2.2. REACTIVOS	227
2.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	227
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	229
3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y METABOLITOS ALTERADOS	231
3.2. METABOLÓMICA DE ENSAYOS DE EXPOSICIÓN A FÁMACOS UTILIZANDO LA GLÁNDULA DIGESTIVA DE <i>R. PHILIPPINARUM</i>	235
3.3. METABOLÓMICA EN BRANQUIAS DE <i>R. PHILIPPINARUM</i>	236
IV. CONCLUSIONES	239
V. BIBLIOGRAFÍA.....	243
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS.....	251
CONCLUSIONES GENERALES	255

LISTA DE ABREVIATURAS

PCBs	Compuestos bifenilos policlorados
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
COPs	Compuestos orgánicos persistentes
DDT	Ditiotreitol
PCDF	Dioxinas
PCDD	Furanonas
PhACs	Compuestos farmacéuticamente activos
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
AAS	Espectroscopia de absorción atómica
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
DPASV	Voltamperometría anódica de pulso diferencial
XRF	Fluorescencia de Rayos X
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente
ICP-AES	Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente
PIXE	Emisión de rayos X inducida por partículas
GC-ECD	Cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica
GC-FID	Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llamas
2-DE	Electroforesis Bidimensional
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
CE	Electroforesis capilar
GC	Cromatografía de gases
ESI	Fuente de ionización por electrospray

LISTA DE ABREVIATURAS

MALDI	Fuente de ionización-desorción láser asistida por matriz
Q-TOF	Cuadrupolo-tiempo de vuelo
QqQ	Triple cuadrupolo
IT	Trampa iónica
Q-Trap	Cuadrupolo-trampa de iones
QqQTOF	Triple cuadrupolo tiempo de vuelo
MAA	Procedimientos analíticos multidimensionales
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño
RPC	Cromatografía en fase reversa
IEC	Cromatografía de intercambio iónico
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica
IMAC	Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados
AEC	Cromatografía de intercambio aniónico
Q	Analizador de masas cuadrupolo
TOF	Analizador de masas tiempo de vuelo
SF	Analizador de masas de sector magnético
MC	Analizador de masas multicolector
GE	Electroforesis en gel
LA	Ablación láser
FTIRC	Resonancia de ion ciclotrón con transformada de Fourier
MS	Espectrometría de masas
nHPLC	Nano cromatografía líquida de alta resolución
IEF	Isoelectroenfoque
BN	Blue Native

SDS	Dodecilsulfato sódico
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
XRF SR	Fluorescencia de rayos X inducida por radiación de sincrotrón
XAS	Espectrometría de absorción de rayos X
Cys	Cisteína
CYP	Citocromo P450
NADPH	Nicotín Adenín Dinucleótido (fosfato) reducido
UDP	Uridín Difosfato
ATP	Adenosín Trifosfato
GSTs	Glutación-S-transferasas
GSH	Glutación reducido
PAPSO	Fosfoadenosín fosfosulfato
EROs	Especies reactivas de oxígeno
His	Histidina
Trp	Triptófano
Pro	Prolactina
LOOH	Lipohidroperóxidos
SOD	Superoxido dismutasa
CAT	Catalasa
GSHPx	Glutación peroxidasa
MTs	Metalotioneinas
LPO	Peroxidación lipídica
ARE	Elementos de respuesta antioxidantes

LISTA DE ABREVIATURAS

MRE	Elementos de respuesta metálica
PND	Parque Nacional de Doñana
RMN	Resonancia magnética nuclear
CZE	Electroforesis Capilar de Zona
AFC	Cromatografía de Afinidad
UV/Vis	Ultravioleta/Visible
ESI	Electrospray
CID	Disociación inducida por colisión
cps	Cuentas por segundo
rpm	Revoluciones por minuto
LDP	El Lucio del Palacio
ROC	Arroyo La Rocina
PAR	El Partido
AJO	El Ajolí
MAT	El Matochal
BER	Bernabé
TCEP	Hidrocloreuro de tris-(2-carboxietil)fosfina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
BHT	Butilhidroxi tolueno
AsB	Arsenobetaína
MMA	Ácido metilarsónico
DMA	Ácido dimetilarsínico
TEMA	Ión tetrametilarsonio
TETRA	TEMA

LISTA DE ABREVIATURAS

TMA+	TEMA, TETRA
TMAO	Óxido de trimetilarsina
IBU	Ibuprofeno
CBZ	Carbamazepina
DCF	Diclofenaco
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
MoA	Modo de acción tóxica
VIP	Variable de importancia en la proyección
C	Control zero
SW-C	Control de agua de mar
SC	Control de disolvente

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

Los invertebrados acuáticos son muy buenos bioindicadores que resultan particularmente útiles para evaluar la calidad de los ecosistemas acuáticos; las especies indicadoras deben reunir una serie de características como poseer una amplia distribución y una gran abundancia; además presentar una relación entre el contenido de contaminante en sus tejidos y la concentración de éste en el ambiente. Por otro lado, son adaptables a estudios de laboratorio. Estos organismos han sido empleados en numerosos trabajos de investigación, en relación con la capacidad de acumulación de contaminantes y para determinar los cambios producidos en sus rutas metabólicas debido a exposición a xenobióticos, en la línea de nuestro estudio, metales y fármacos; lo que ha determinado su selección para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

La problemática de la contaminación ambiental en ecosistemas acuáticos debido a actividades antropogénicas ha provocado que en los últimos años exista un especial interés en el estudio de biomarcadores, que son parámetros biológicos medidos en los organismos bioindicadores, que indican, al alterarse sus niveles, la exposición a estos contaminantes, sus efectos biológicos o los riesgos de su presencia en los ecosistemas. El análisis de biomarcadores convencionales es un instrumento clave para detectar el impacto de la contaminación sobre la salud de los ecosistemas, aunque se requiere un profundo conocimiento sobre los mecanismos toxicológicos en los que se ven envueltas las sustancias. Por esta razón las ómicas son ahora la nueva herramienta para evaluar la respuesta biológica global a la contaminación, en concreto la presencia y modificaciones que sufren las metalobiomoléculas y los metabolitos, utilizados como biomarcadores de estrés ambiental. Las nuevas tecnologías analíticas para el estudio de la respuesta biológica, en particular el empleo de procedimientos de especiación basados en acoplamiento HPLC-ICP-MS y las técnicas de extracción de especies químicas rápidas y eficaces junto a técnicas de masas en tandem (Q-TOF), están abriendo nuevas posibilidades en el estudio y caracterización de metalobiomoléculas y metabolitos. Asimismo, el desarrollo de técnicas metalómicas que utilizan cromatografía multidimensional (SEC-HPLC) y detección ICP-MS, y métodos metabolómicos mediante espectrometría de masas por infusión directa y análisis estadístico multivariante constituyen herramientas muy poderosas e innovadoras que pueden ser útiles en la biomonitorización de ecosistemas contaminados y en el estudio de la acción de sustancias contaminantes sobre organismos bioindicadores.

El presente estudio se centra en la evaluación y seguimiento de la contaminación ambiental del suroeste de la Península Ibérica utilizando como bioindicadores tres invertebrados, los moluscos *Scrobicularia plana* y *Ruditapes philippinarum* y el crustáceo *Procambarus clarkii*, en los que se han estudiado la presencia y modificaciones que sufren biomarcadores de estrés ambiental (metalobiomoléculas y metabolitos). Asimismo se ha llevado a

RESUMEN

cabo experiencias de exposición a fármacos en ambientes controlados para evaluar cambios producidos en las rutas metabólicas.

El estudio de la contaminación ambiental en el suroeste de la Península Ibérica (Algarve-Cádiz-Parque Nacional de Doñana y alrededores) se ha llevado a cabo mediante el análisis de biomarcadores relacionados con el estrés ambiental, concretamente metalobiomoléculas, utilizando invertebrados *Scrobicularia plana* y *Procambarus clarkii* icapturados en distintas zonas de estudio. Para ello se ha desarrollado un procedimiento metalómico basado en el acoplamiento de la cromatografía de exclusión de tamaño con detección elemental ICP-MS, el cual se ha aplicado a diferentes órganos con objeto de identificar posibles cambios de expresión de metalobiomoléculas como consecuencia de la contaminación ambiental. Además, en el caso de *Procambarus clarkii*, en base a los resultados obtenidos, se han estudiado otros biomarcadores relacionados con la contaminación por metales (metalotioneínas y peroxidación lipídica) y se ha desarrollado un método analítico para especiación de arsénico mediante cromatografía iónica acoplada a ICP-MS para comparar zonas contaminadas y no contaminadas.

Por otro lado, se ha desarrollado un procedimiento metabolómico, en el contexto de la metabolómica medioambiental, mediante la extracción rápida de metabolitos y detección por espectrometría de masas en tándem por infusión directa (ESI-QqTOF) con la el objetivo de encontrar biomarcadoresmetabolómicos relacionados con la respuesta al estrés ambiental en distintos órganos del cangrejo *Procambarus clarkii*. En este sentido, se ha desarrollado en la presente Tesis un estudio de exposición a diferentes fármacos (ibuprofeno, carbamazepina y diclofenaco) en condiciones de laboratorio, en el que se realiza este mismo procedimiento metabolómico para el estudio de la respuesta biológica del bioindicador bivalvo *Ruditapes philippinarum*, con objeto de identificar posibles cambios en rutas metabólicas como consecuencia de la exposición a estos contaminantes emergentes. Al tratarse de crustáceos y moluscos bivalvos, poseen un metabolismo más sencillo que permite realizar de forma simplificada ensayos de exposición a elementos tóxicos, extrapolables, posteriormente a organismos más complejos.

En general, esto convierte a estos organismos en bioindicadores muy adecuados para estudios de toxicidad y contaminación ambiental, mediante la comparación de la respuesta biológica al estrés y los diferentesniveles de expresión de metalobiomoléculas y metabolitos relacionadas con exposición a elementos tóxicos.

OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo general la evaluación y seguimiento de la contaminación ambiental del suroeste de la Península Ibérica utilizando como bioindicadores tres invertebrados, los moluscos *Scrobicularia plana* y *Ruditapes philippinarum* y el crustáceo *Procambarus clarkii*, en los que se han estudiado la presencia y modificaciones que sufren las metalobiomoléculas y los metabolitos, utilizados como biomarcadores de estrés ambiental. Así como evaluar el impacto de contaminantes emergentes (fármacos) en especies que pueden ser empleadas como bioindicadores de estrés de este tipo de sustancias.

Dicho objetivo general se desarrolla en los siguientes objetivos concretos:

1.- Seguimiento y evaluación de la contaminación ambiental en 6 zonas de la costa del Suroeste de la Península Ibérica (costa de El Algarve y Bahía de Cádiz), estudiando las modificaciones que se producen en las metalobiomoléculas presentes en el bivalvo *Scrobicularia plana* procedente de las distintas áreas localizadas en marismas y ecosistemas acuáticos de la región transfronteriza de España y Portugal, utilizando un procedimiento metalómico basado en el acoplamiento de un sistema cromatográfico de exclusión de tamaño (SEC) con un sistema de detección multielemental, ICP-MS.

2.- Seguimiento y evaluación de la contaminación ambiental en 6 zonas del Parque Nacional de Doñana y alrededores con diferentes niveles de contaminación debido a su proximidad a zonas de actividad agrícola, minera e industrial. Se estudiará la presencia de en diferentes órganos del cangrejo *Procambarus clarkii* (utilizado como especie bioindicadora), procedente de las zonas en estudio. Se aplicará de forma integrada metodologías convencionales basadas en “target analysis” y los procedimientos metalómicos descritos en el Objetivo 1 (“non-target analysis”).

3.- Búsqueda de biomarcadores metabolómicos relacionados con la respuesta al estrés ambiental en distintos órganos del cangrejo *Procambarus clarkii*, utilizado como bioindicador en las zonas de muestreo descritas en el Objetivo 2. Para ello se ha desarrollado un método metabolómico mediante espectrometría de masas por infusión directa y análisis estadístico multivariante.

4.- Estudio de la respuesta biológica del bioindicador bivalvo *Ruditapes philippinarum* sometido a experiencias de exposición a diferentes fármacos (ibuprofeno, carbamazepina y diclofenaco) en condiciones de laboratorio controladas, con objeto de identificar posibles cambios en rutas metabólicas como consecuencia de la exposición a estos contaminantes emergentes. Para ello se utilizó el procedimiento metabolómico propuesto en el Objetivo 3.

INTRODUCCIÓN

1. LA PROBLEMÁTICA DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y SU DIAGNOSIS

El medio ambiente se ha convertido en una de las principales preocupaciones de los países desarrollados. Este creciente interés surge, fundamentalmente, de tres circunstancias:

La insostenible sobreexplotación a que están sujetos los recursos naturales, que compromete seriamente el abastecimiento para el futuro.

El deterioro de la calidad de vida que para los propios humanos conlleva la degradación ambiental.

La obligación moral que tienen las generaciones actuales de preservar el patrimonio natural para generaciones venideras.

Sin embargo, el incremento de la población, unido al aumento del consumo de productos procesados y de la actividad industrial de las sociedades modernas, demanda cada vez más una cantidad creciente de recursos, que explotados irracionalmente no garantizan su sostenimiento a largo plazo, requiere una dedicación cada vez mayor de tierras para su explotación, deteriora y contamina los hábitats naturales del planeta y desplaza hacia espacios cada vez más reducidos a las demás especies, provocando graves pérdidas de biodiversidad.

Se pueden citar algunas de las actividades antropogénicas más relevantes que afectan al medio ambiente, como las de transformación (química, metalúrgica, petrolera, etc.), las extractivas mineras, y las agroquímicas, como la introducción de nuevos plaguicidas y fertilizantes en la agricultura intensiva. Además, no podemos obviar las grandes catástrofes medioambientales, como los vertidos accidentales al mar o los ríos y los desastres ecológicos. Este tipo de actividades alteran el equilibrio natural de un ecosistema, ya que liberan sustancias tóxicas minerales (metales pesados y sus compuestos, materiales radiactivos, etc.) u orgánicas (plaguicidas y fertilizantes, dioxinas, hidrocarburos, etc.), en cantidades que causan efectos adversos en el hombre, los animales y/o vegetales expuestos a dosis que sobrepasen los niveles aceptables en la naturaleza. Todo ello afecta a la supervivencia de los organismos, perturba la estructura y función de los ecosistemas naturales, modificando el número de especies (por introducción de especies exóticas o eliminación de las nativas), y la diversidad de ecosistemas y hábitats naturales [1-4].

Una definición de polución es la dada por Holister and Porteous en su Diccionario del Medio Ambiente [5]: “Un contaminante es aquella sustancia que altera el medio ambiente por cambios en las rutas de crecimiento de las especies, interfiere la cadena alimenticia, es tóxico, o

INTRODUCCIÓN

interfiere en la salud, confort, comodidades o propiedades de la gente". En términos generales la contaminación causa degradación y daños en el funcionamiento natural de la biosfera. El daño causado se puede resumir en los siguientes puntos:

- Daños en la salud humana causados por sustancias químicas específicas presentes en el aire, comida y agua, y radioactividad.
- Daños en el medio ambiente con efectos en la vegetación, animales, suelo y agua.
- Daños en la calidad estética del medio ambiente causados por los humos industriales y ruido entre otros.
- Daños causados por contaminación a largo plazo, como los causados por sustancias que pueden ser absorbidas por el organismo durante largos periodos, por ejemplo sustancias carcinogénicas, radioactividad o ruido excesivo [5].

Muchos contaminantes son *xenobióticos*, compuestos extraños a los seres vivos que se incorporan a sus rutas bioquímicas [6-7]. La mayoría han aparecido en el medio ambiente durante los últimos 100 años en los cuales se ha producido un espectacular aumento de la fabricación y uso de compuestos químicos sintéticos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas, dibenzofuranos, tributil estaño, nitroaromáticos, organofosforados, carbamatos, metales, organoclorados (p.ej., dieldrinas, DDT, hexaclorohexanos, hexaclorobencenos y clorofenoles) [8]. Las principales clases de xenobióticos de importancia médica son los fármacos, carcinógenos químicos y varios compuestos que han llegado a nuestro ambiente de una u otra forma, como bifenilos policlorinados (PCB) y ciertos insecticidas.

Los mares del planeta han sido utilizados tradicionalmente como enormes basureros, considerando que eran capaces de absorber y diluir toda clase y volumen de desechos originados por la actividad humana. Sin embargo, el ingente vertido de todo tipo de residuos ha saturado la capacidad de almacenamiento de estas aguas. Cada año, miles de millones de toneladas de sustancias tóxicas, elementos radiactivos, metales pesados como los compuestos del mercurio o productos químicos (pesticidas y biocidas en general), están contribuyendo a que se alcancen índices de contaminación hasta ahora desconocidos.

Por otro lado, la presión humana sobre las áreas litorales del planeta es enorme y va en aumento. En este sentido, cabe destacar que el 60% de la población mundial, unos 3.000 millones de personas, viven a menos de 60 Km de la costa, esperándose que para el año 2100 esta proporción llegue a alcanzar el 75%. Las prácticas humanas producen diariamente una serie de desechos, no procesados y libremente vertidos, que se convierten en contaminantes y

deterioran seriamente la calidad ambiental del territorio. Este es el caso de las aguas residuales y los vertidos sólidos urbanos. Puesto que sólo una parte del caudal de aguas residuales producido es depurado antes de su vertido a los cursos de agua naturales y, gran parte de los residuos sólidos producidos vertidos incontroladamente sin ningún tipo de tratamiento.

Más del 75% de la contaminación marina se origina por los deshechos originados por el uso urbano y rural de las tierras. La agricultura practicada en el interior suele tener efectos contaminantes en la franja costera, debido al depósito de abonos y biocidas que son arrastrados por las lluvias a las aguas litorales, así como por la contaminación directa de acuíferos con conexión marina. También el exceso de nutrientes procedentes de aguas residuales, abonos, residuos orgánicos, etc. provoca procesos de eutrofización, con el correspondiente crecimiento rápido del plancton y la descomposición de algas, que disminuyen la proporción de oxígeno disuelto y produce la muerte de peces y otras formas vivas del medio acuático.

Por último, también es destacable la alteración de las desembocaduras de las cuencas fluviales o la construcción de infraestructuras en las áreas litorales, como puertos, embarcaderos, espigones, playas artificiales y otras construcciones costeras que afectan negativamente a la dinámica de las aguas costeras, y a la distribución de las distintas especies, llegando a modificar los perfiles costeros y sus comunidades biológicas.

Para poder hacer frente a toda esta problemática se hace cada vez más necesario un monitoreo, evaluación y diagnóstico medioambiental de las zonas costeras para definir qué ecosistemas están contaminados, los contaminantes implicados y sus fuentes, y evaluar sus efectos en los seres vivos [9]. La medida del efecto de la actividad humana en términos de calidad ambiental requiere el estudio de los efectos de los contaminantes en organismos indicadores, *bioindicadores*. Éstos responden a los xenobióticos y predicen su impacto ambiental antes de que sea irreversible, a diferencia de los análisis químicos clásicos, que sólo detectan parte de los xenobióticos presentes en un ecosistema y no revelan sus efectos en los organismos [10-11]. Como ejemplos pueden citarse los moluscos y los crustáceos que han sido utilizados frecuentemente como bioindicadores de contaminación en ambientes acuáticos [12-14]

El presente estudio considera la evaluación y seguimiento de la contaminación ambiental de áreas litorales del suroeste de la Península Ibérica usando invertebrados (moluscos y crustáceos) como bioindicadores de contaminación, al tratarse de organismos de vida libre. Asimismo, se evalúa el modo de acción de los contaminantes mediante experiencias de exposición, realizadas con estos organismos. En relación a ello, es necesario analizar cuáles son las fuentes de contaminación en ecosistemas acuáticos de estas áreas costeras y estuarinas,

INTRODUCCIÓN

haciendo especial hincapié en los contaminantes emergentes que han sido objeto de estudio en el presente trabajo, *metales y fármacos*.

El estudio se enmarca en el Proyecto I2TEP; liderado por la Universidad de Huelva, integrado en la Red de Investigación y Transferencia Transfronteriza España-Portugal, para el intercambio de conocimiento en el territorio transfronterizo Huelva-Algarve-Baixo Alentejo-Cádiz-Sevilla, que recoge las demandas sociales en el eje del Guadiana, sobre todo las relacionadas con la sostenibilidad, salud y educación ambiental, dentro del Programa de Cooperación Transfronteriza España-Portugal (POCTEP) 2007-2013.

1.1. Los metales en el medioambiente: esencialidad y toxicidad.

Los metales están presentes en el medio ambiente de forma natural en cada uno de los componentes de la Tierra: litosfera (corteza terrestre), hidrosfera, atmósfera y biosfera. La figura 1 representa de manera esquemática la circulación de metales pesados a través de los diferentes compartimentos medioambientales. Entre los contaminantes potencialmente más tóxicos para el medio ambiente se encuentran los metales pesados como As (metaloide), Cd, Cu, Cr, Hg, Ni y Pb, éstos forman parte de los ciclos biogeoquímicos que determinan su presencia y concentración en los distintos componentes de los ecosistema.

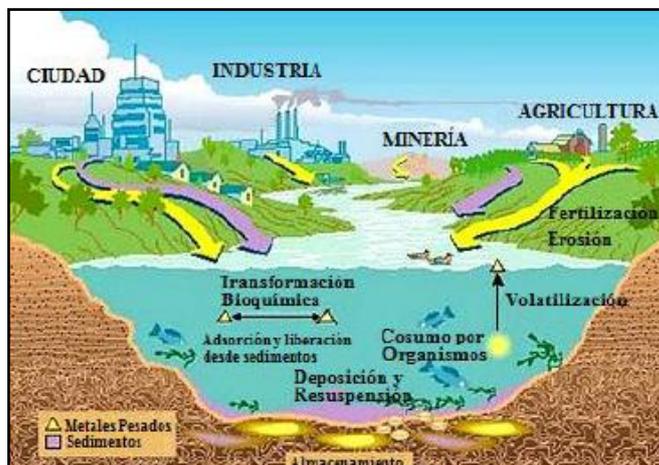


Figura 1. Ciclos biogeoquímicos de los metales pesados

Los metales pesados, circulan a través de todos los compartimentos con diferentes tiempos de residencia, pero los correspondientes a suelos y sedimentos varían entre cientos y millones de años, por lo que pueden considerarse como reservorios temporales estables, donde los metales quedan retenidos hasta que vuelven a ser removilizados.

Las fuentes de contaminación se pueden dividir en naturales y antropogénicas. Entre las fuentes naturales más relevantes están la erosión química de rocas metamórficas y los animales

y plantas en descomposición. Respecto a la presencia de metales en la atmósfera, las fuentes naturales que más contribuyen a su presencia son las derivadas de procesos volcánicos, erosión de rocas, aerosoles y partículas procedentes de la superficie de los océanos [15]. La perturbación del ciclo biogeoquímico natural de los metales por la acción del hombre viene produciéndose ya desde la Edad de Bronce aunque la extracción de metales se ha incrementado enormemente desde la Revolución Industrial. Las fuentes antropogénicas más importantes son las actividades relacionadas con la minería, fundición y refinado o aquellas que implican el vertido de aguas residuales de industrias siderúrgicas, de actividades domésticas o las relacionadas con la agricultura, tratamiento de superficies, curtidos, etc. Durante todos esos procesos se liberan metales al medio ambiente [15, 16] además de los procedentes de la combustión de fósiles y carbón [17]. Por otro lado, durante la vida útil del metal, éste está sujeto a corrosión y desgaste, lo cual implica a su vez liberación al medio ambiente [16]. Los metales se dispersan, bien de forma natural o como ya se indicó anteriormente como consecuencia de actividades industriales, a través del aire, tierra y agua; pero la mayoría de los contaminantes metálicos terminan en las aguas superficiales y los que se emiten a la atmósfera acaban depositándose en la litosfera mediante la lluvia [16, 18]. Por otro lado, para tener una estimación global, se suelen realizar medidas no sólo en las áreas habitadas, sino también en áreas remotas como la Antártica o sobre materiales existentes antes de la industrialización [19].

La persistencia de los metales en el medio ambiente es importante ya que son esencialmente biodegradables, pudiendo, además, transformarse en otras especies más tóxicas que las originales. Por ello es importante saber en qué estado tanto físico como químico se encuentran las diferentes especies metálicas para poder estimar su biodisponibilidad [16, 20]. Los estados de oxidación de los metales pueden provocar importantes consecuencias medioambientales en relación a la contaminación. En este sentido, la solubilidad de los metales suele ser mayor en estados oxidados y en ambientes ácidos. A pHs más alcalinos y neutros se suelen absorber sobre la superficie de partículas de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ insoluble o partículas de MnO_2 [20, 21]. Los elementos metálicos se depositan en los sedimentos y producen procesos de coprecipitación. Las interacciones con los sedimentos se producen mediante diversos procesos físico-químicos, como la adsorción, cambio iónico o formación de complejos con puntos activos del sedimento, fundamentalmente [22].

En los seres vivos, algunos metales generan especies reactivas de oxígeno que promueven estrés oxidativo y daño a nivel de biomoléculas, lo que genera el estado de determinadas proteínas e induce enzimas antioxidantes [22-24]. En relación con la influencia de los metales en los seres vivos, es importante distinguir entre elementos esenciales y tóxicos. De esta forma, existen elementos que, estando presentes en los tejidos en cantidades muy pequeñas, al nivel de trazas (mg/L) y ultratrazas ($\mu\text{g/L}$), son nutrientes esenciales. De los veintiún

INTRODUCCIÓN

elementos reconocidos como esenciales para los organismos vivos, once de ellos son metales (Na, K, Mg, Ca, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn). Estos elementos realizan funciones indispensables para el mantenimiento de la vida, el crecimiento de los seres vivos y su reproducción. A estos elementos esenciales, cuya deficiencia en el hombre ha sido ampliamente estudiada, se les denominan también oligoelementos. Se considera que un elemento traza es esencial si: (i) su ingesta insuficiente produce deficiencias funcionales, las cuales pueden revertir cuando el elemento recupera su nivel fisiológico óptimo, (ii) el organismo no puede crecer ni completar su ciclo vital sin este elemento, (iii) el elemento posee una influencia directa sobre el organismo y está involucrado en sus procesos metabólicos, (iv) el efecto concreto de un elemento esencial no puede sustituirse totalmente por ningún otro elemento [25].

El carácter esencial de un oligoelemento conduce inmediatamente a relacionarlo con el concepto de requerimiento. Se ha de establecer una cantidad mínima del citado oligoelemento para el buen funcionamiento del organismo. Sin embargo, todos los elementos pueden originar procesos de intoxicación si la dosis ingerida de sus compuestos es lo suficientemente elevada. Así, podemos decir, que para los elementos esenciales existe un umbral de concentración mínimo que genera una actividad metabólica insuficiente, una concentración mayor asociada con un funcionamiento bioquímico óptimo y, por encima de ésta, concentraciones que tienen carácter tóxico e incluso, letales. Por tanto, existe un rango de concentración, una ventana biológica, para cada oligoelemento donde la respuesta fisiológica es óptima, fuera del cual se observan efectos carenciales o tóxicos [25].

Además de los elementos traza esenciales en los organismos vivos, pueden existir otros a nivel traza y ultratrazas, como son As, Cd, Hg, Tl, Pb o Bi, sin una función fisiológica conocida hasta la fecha, que pueden alterar seriamente su metabolismo, originando fenómenos de intoxicación aguda o crónica a muy bajas concentraciones ($\mu\text{g/L}$). Estos elementos se califican como tóxicos.

El As es tóxico para la mayoría de las formas de vida, aunque se han encontrado bacterias en un lago de California que sustituyen el habitual fosfato por este elemento tóxico, para vivir y desarrollarse [26]. Asimismo, al incorporarse en la cadena alimentaria, el As inorgánico y sus compuestos son progresivamente metabolizados en organismos marinos, transformados en una forma menos tóxica del elemento mediante un proceso de metilación [27]. El Cd es conocido como tóxico ya que produce daños irreversibles en los pulmones y especialmente en el riñón, donde llega en forma de Cd-metalotioneína [28]. El Pb a niveles de traza puede afectar negativamente al cerebro, el sistema nervioso central, las células sanguíneas y los riñones, pudiendo formar parte de la estructura de la metalotioneína [29]. El Hg en todas

sus formas químicas puede causar graves problemas de salud, afectando al sistema nervioso e inmunitario entre otros [30].

Por otro lado, la clasificación de elementos esenciales no es absoluta ya que algunos elementos, históricamente considerados como tóxicos, son ahora considerados como esenciales. Como es el caso del Se, Cr [31] y, más recientemente el [32], este último considerado como esencial. Además, hay elementos con un doble carácter esencial/tóxico dependiendo de la concentración y/o forma química en la que se encuentren (tales como el, Se y Cr). Finalmente existen elementos que se suministran con fines terapéuticos, como es el caso del Li, Ba, Tc, Pt, Au y Bi, cuya concentración en el organismo debe controlarse igualmente. El ejemplo paradigmático es el cisplatino utilizado en el tratamiento del cáncer [32].

Por ello, la determinación de los elementos traza en muestras tanto biológicas como medio ambientales es muy importante para elucidar la relación entre los elementos químicos y los seres vivos, comprender el nexo entre el estado de salud y los problemas de exposición medioambiental y para realizar diagnósticos clínicos, entre otros [33].

1.2. Los fármacos en el medioambiente

En el primer tercio del siglo XX se introdujeron en los tratamientos terapéuticos los primeros barbitúricos, los arsenicales y la insulina, pero no fue hasta los años cuarenta cuando comenzó la introducción masiva de nuevos fármacos [34]. Este avance en la mejora de la salud tiene un coste medioambiental, por la presencia de los productos farmacéuticos en los ambientes acuáticos. Estos contaminantes de nueva generación se consideran emergentes porque no existe una normativa reguladora de sus niveles en las aguas y porque su uso es incontrolado y su producción de alto nivel.

Los fármacos que se vierten en el medio ambiente suelen obtenerse por síntesis orgánica y su paso a través de los sistemas biológicos no garantiza su total biotransformación. Cabe destacar que muchos de estos compuestos son transformados en su totalidad en el hígado y otros son eliminados casi en su totalidad, pero los que permanecen llegan a los sistemas acuáticos provocando alteraciones ambientales o bioacumulación en algunos de los niveles de la cadena trófica [35]. Cabe destacar que los productos farmacéuticos son formulaciones complejas y que sus coadyuvantes también generan productos de transformación, que interactúan con la materia orgánica y bajo las condiciones propias del ecosistema, pueden ser potencialmente más tóxicos e incluso más bioacumulables.

Los productos farmacéuticos no eran considerados contaminantes ambientales dado que se desconocía su acumulación o la de sus productos de transformación en suelos, aguas, aire,

INTRODUCCIÓN

tejidos vegetales y tejidos animales. A partir de los años noventa se empezaron a cuantificar en las aguas, verificándose su presencia en niveles de partes por billón (ppb) y partes por trillón (ppt) [36].

La mayoría de los estudios sobre productos farmacéuticos se han realizado en los países del norte o centro de Europa, así como en los Estados Unidos. Aunque se está ampliando la información disponible en los países mediterráneos [37-38].

En estudios recientes se ha informado que en países como España, Italia, Alemania, Canadá, Brasil, Grecia y Francia se vierten al agua, aproximadamente, 500 toneladas de analgésicos por año, en donde el ácido salicílico y el diclofenaco han alcanzado concentraciones de 0,22 µg/L y 3,02 µg/L, respectivamente [35].

Los contaminantes convencionales como agroquímicos, policlorados bifenílicos (PCB), ftalatos, dioxinas (PCDD), furanonas (PCDF), hidrocarburos poliaromáticos (PAH) e ignífugos, entre otros, han sido objeto de estudios analíticos y prácticas de reducción de su presencia, con objeto de contrarrestar o minimizar sus impactos ambientales negativos; pero en los años 90, algunos efluentes de sistemas de tratamiento de aguas residuales empezaron a mostrar concentraciones significativas de productos farmacéuticos y se pusieron en marcha diversas investigaciones para su identificación y cuantificación [39].

Los productos farmacéuticos alcanzan los cuerpos de agua (aguas superficiales, ríos, lagos, etc.) por la excreción de hombre y animales, los vertidos de la industria farmacéutica, los residuos hospitalarios, la eliminación inadecuada de fármacos vencidos o no utilizados, y los vertidos de instituciones de investigación y desarrollo de fármacos, entre otros.

Las plantas de tratamiento de aguas residuales son una importante fuente de descarga de estos compuestos en el medio ambiente [40]. De hecho, algunos productos farmacéuticos no son totalmente eliminados por la tecnología convencional utilizada en el tratamiento de aguas residuales [41]. En un estudio llevado a cabo en plantas de tratamiento de aguas residuales Alemania, se concluyó que los fármacos como la carbamazepina, atenolol, metoprolol, trimetoprim y diclofenaco sólo son eliminados en un 10%, mientras que compuestos como la carbamazepina y el propranolol, se eliminan en un 7% y 96%, respectivamente [42]

Existen determinados factores que han influido de forma especial en la presencia y persistencia de estos principios activos en las aguas, como la demanda por parte de la población, la frecuencia de administración, la automedicación, el consumo ilícito de drogas, y los propios procesos fisiológicos unidos al consumo [36]. Como ejemplo pueden citarse los datos publicados en relación a Alemania [43], donde cientos de toneladas de principios activos farmacéuticos de alta demanda son incorporados al ambiente. De igual forma, los sistemas

hospitalarios incorporan antimicrobianos al agua, promoviendo la generación de microorganismos resistentes y alteraciones en la actividad enzimática de la microbiota, lo cual interrumpe los procesos de biodegradación propia de materia orgánica en los cuerpos de agua [44]. Sin embargo, poco se conoce sobre los efectos crónicos de los fármacos en el ambiente, aunque algunos ensayos ecotoxicológicos alertan del gran problema.

Al encontrarse estos fármacos en concentraciones muy bajas en las plantas de tratamiento de aguas, no se le ha prestado hasta ahora suficiente atención, siendo necesario buscar métodos alternativos para evaluar su riesgo. Con este propósito, en el Capítulo 4 de esta Tesis se describe la puesta punto de una herramienta de evaluación de productos farmacéuticos en ecosistemas acuáticos basada en técnicas más precisas de estimación de la toxicidad que hacen uso del análisis metabolómico en tejidos de especies marinas con una alta sensibilidad a los cambios en su hábitat. Debido a ello, estos estudios establecen biomarcadores precisos de la calidad de las aguas, ya que se relacionan con la presencia de medicamentos y actúan como un sistema de alerta temprana ante posibles daños en el entorno.

Los efectos de los *compuestos farmacéuticamente activos* (pharmaceutically active compounds: PhACs) a los que los organismos acuáticos son expuestos de forma continua no han sido ampliamente estudiados, quizás debido a la falta de métodos analíticos adecuados [45]

Los analgésicos constituyen uno de los fármacos de mayor consumo mundial y son considerados los de mayor automedicación [46]. En medicina humana, varios PhACs se utilizan con frecuencia como la carbamazepina, el diclofenaco y el ibuprofeno (figura 2). Estos son los fármacos que se usaron en el diseño experimental descrito en el Capítulo 5, los cuales se seleccionaron por ser los más utilizados para distintos tipos de dolencias; se consideraron dos antiinflamatorios, el ibuprofeno y el diclofenaco y un anticonvulsivo, la carbamazepina.

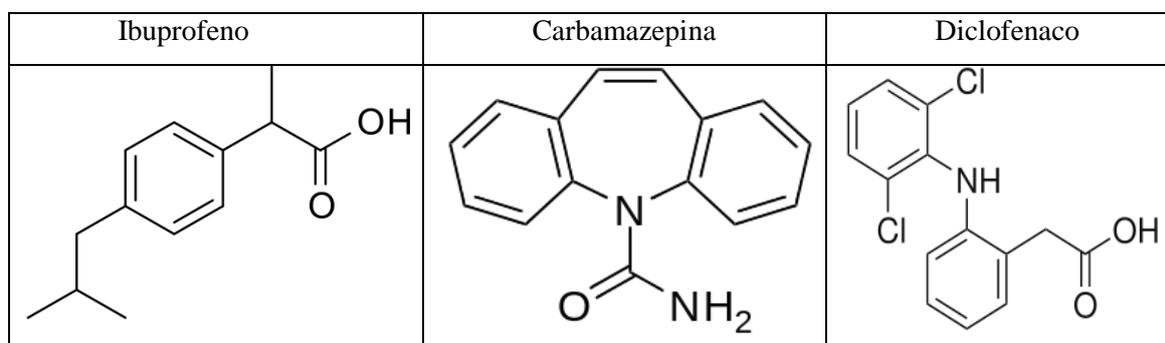


Figura 2. Estructura molecular de los fármacos estudiados en esta Tesis

El diclofenaco y el ibuprofeno, son antiinflamatorios no esteroideos (AINE), que actúan por inhibición de la síntesis de prostaglandinas mediante el bloqueo de la actividad de la ciclooxigenasa [47]. Se prescriben a los seres humanos para tratar una variedad de dolores

INTRODUCCIÓN

agudos y crónicos y estados inflamatorios. Entre los productos farmacéuticos humanos, el diclofenaco es el más comúnmente encontrado en el medio acuático [48]. La carbamazepina se utiliza para el tratamiento de la epilepsia y tiene la función fisiológica de estabilizar el estado inactivado de los canales de sodio, por lo que las células cerebrales se convierten en menos excitables.

En los últimos años, la capacidad de PhACs para interrumpir el la función endocrina normal de la vida silvestre es de gran preocupación [49]. Una consecuencia de ello es la feminización de peces machos en los ríos del Reino Unido, hecho muy extendido que relaciona con la exposición a compuestos disruptores endocrinos presentes en el medio ambiente [50].

Se sabe mucho menos sobre el alcance y la magnitud de las alteraciones endocrinas en los ecosistemas estuarinos y marinos, en particular en los invertebrados, que se han utilizado ampliamente como organismos centinelas marinos (por ejemplo bivalvos) [51]. Con este fin, los bivalvos son considerados biomonitores o bioindicadores muy sensibles, que permiten la investigación de los cambios ambientales, debido a su alta tasa de filtración, su capacidad de bioconcentración de tóxicos, su ubicuidad, abundancia e importancia en las cadenas tróficas de los ambientes estuarinos [52].

Además, entre los tejidos estudiados en invertebrados, el órgano principal para la regulación metabólica es la glándula digestiva; que participa en los mecanismos de defensa inmune y regulación homeostática del medio interno (por ejemplo calcio, pH hemolinfática, volumen celular), y en los procesos de detoxificación y eliminación de xenobióticos. En cambio, el seguimiento de las células del sistema branquial, se considera una aproximación rápida para la evaluación de la contaminación en los ecosistemas marinos [53].

1.3. Monitoreo y diagnóstico medioambiental

Lo comentado previamente inidica la necesidad de llevar a cabo seguimientos periódicos de diferentes contaminantes en los ecosistemas, con objeto de evaluar su calidad medioambiental. El monitoreo de contaminantes en el medio ambiente proporciona información de los efectos tóxicos, si existen, causados por los contaminantes, ayudando a conocer las áreas de impacto y lugares donde la concentración es manifiesta. Además, es útil conocer la tendencia de estos contaminantes a lo largo del tiempo, ya que los datos que se obtengan permiten relacionar la presencia de una determinada sustancia tóxica con los problemas medioambientales que origina.

Generalmente, los estudios para evaluar la contaminación ambiental de entornos naturales costeros amenazados se han basado en el análisis químico de elementos traza tóxicos

como Cd, As, Pb, Hg y otros, así como de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) como plaguicidas, PCBs e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) principalmente, muy resistentes a la degradación por sistemas biológicos, fotolíticos o químicos lo que hace que mantengan sus efectos perjudiciales a largo plazo. Entre éstos destacan los compuestos orgánicos halogenados o compuestos organoclorados. Entre los organohalogenados se encuentran: PCBs, dioxinas, furanos, hexaclorobenceno, atrazina y simazina, mirex, toxafeno, heptacloro, clordano, DDT, etc. La alta lipofiliidad (afinidad por grasas y lípidos) de estos compuestos determina su bioconcentración en los organismos.

Estas sustancias predominan en entornos naturales contaminados por actividades antropogénicas tales como la agricultura, la minería, la industria y los vertidos accidentales [54-56] y pueden acceder a los entornos naturales a través de los ríos, y de ahí se distribuyen por todos los compartimentos de los ecosistemas, poniendo en peligro a todos los organismos que lo habitan.

No obstante, el análisis de las concentraciones totales de metales o contaminantes orgánicos en agua, sedimentos, suelos o biota solo nos da información de la mayor o menor presencia de los mismos en cada tipo de muestra, pero no nos proporciona una información directa sobre su disponibilidad y efectos biológicos en los organismos a la hora de monitorizar un ecosistema. La mejor alternativa para evaluar la contaminación de un ecosistema, sería determinar los contaminantes en la zona de estudio, buscar una especie bioindicadora y evaluar su respuesta a través de diversos biomarcadores [57-60].

Los biomarcadores convencionales reflejan la respuestas de los organismos a las situaciones de estrés provocadas por las perturbaciones ambientales y la contaminación, siendo los más sensibles y tempranos los moleculares [23]. Sin embargo, el uso de estos biomarcadores convencionales exige un profundo conocimiento de sus mecanismos de toxicidad y sólo abordan procesos conocidos, generalmente muy bien establecidos, pero ignoran otros muchos cambios que puedan experimentar los seres vivos, que pueden pasar desapercibidos, como las modificaciones en la expresión de las proteínas o los metabolitos.

En este sentido, el estudio de la respuesta biológica proporciona un sistema de detección integrado para evaluar la biodisponibilidad, bioacumulación y efectos ecotoxicológicos de los contaminantes sobre los organismos [61-62].

Por otro lado, el uso de técnicas de análisis masivo (las -ómicas) constituyen una alternativa prometedora para la diagnosis de problemas medioambientales como puede comprobarse de lo comentado en el siguiente apartado.

INTRODUCCIÓN

En esta Tesis, el uso de invertebrados como *Procambarus clarkii*, *Scrobicularia plana* y *Ruditapes philippinarum* como bioindicadores en el seguimiento y valoración de la contaminación del suroeste de la Península Ibérica ha permitido determinar la existencia y evolución de contaminantes en los ecosistemas acuáticos y terrestres de su entorno, debido a que desarrolla gran parte de su actividad en contacto con los sedimentos. La aplicación a estos organismos de técnicas ómicas como la metabolómica, metalómica y proteómica, ha permitido evaluar la respuesta biológica a los contaminantes estudiados.

2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS MASIVO: METALÓMICA Y METABOLÓMICA MEDIOAMBIENTAL

El estudio de los sistemas vivos constituye un reto permanente para la ciencia y en particular para las disciplinas científicas que contribuyen a su conocimiento y caracterización. La célula, los tejidos biológicos y en definitiva los seres vivos vulneran, en apariencia, los principios de la física relacionados con la transferencia de energía, es bien conocida la paradoja del segundo principio de la termodinámica en su aplicación a la vida. Todo ello se debe a la enorme complejidad presente en los mecanismos celulares y en el funcionamiento general de los seres vivos. En Ciencia se está intentando comprender qué “ocurre” en el interior de la célula, y para ello se precisan nuevas herramientas que permitan obtener una información “masiva” de todas las moléculas, procesos y reacciones que se producen en la célula en un instante dado.

Durante la última década, las tecnologías de análisis masivo (o ciencias ómicas) han generado información muy valiosa y métodos que han permitido una descripción exhaustiva de casi todos los componentes celulares. En este sentido, la genómica permite conocer la información contenida en el núcleo celular, la cual determina el funcionamiento, la evolución y el origen de los genomas. Por tanto, la genómica permite conocer lo que podría ocurrir en un ser vivo, pero la forma de convertir esa información potencial en real y temporal, “aquí y ahora”, es mediante las proteínas, las obreras de las células, las que hacen que el edificio celular exista y funcione. Por ello hay que hablar de la segunda gran ómica, la proteómica, considera el conjunto de proteínas en una célula, tejido u organismo, su localización, estructura, estabilidad e interacción [63-66], y a partir de ahí muchas más: transcriptómica metabolómica, glicómica, secretómica, etc.

La transcriptómica establece la conexión entre las secuencias genómicas y las proteínas codificadas, utilizando la información contenida en el conjunto de moléculas de ARNm o transcritos producidos en una célula o una población de células [67]. Esta ómica nos permite conocer lo que parece que está ocurriendo en un ser vivo. Por otro lado, la proteómica (que

considera el análisis masivo de proteínas en organismos bioindicadores, midiendo la alteración de la expresión proteica bajo la acción de los contaminantes) [63, 66] nos informa sobre lo que provoca que algo ocurra en un ser vivo.

Más recientemente, la metabolómica ha hecho posible obtener la información a nivel de moléculas pequeñas o metabolitos, que determinan el funcionamiento del ser vivo y cuya concentración varía como consecuencia de cambios fisiológicos [68-69]. Esta ómica se considera de especial interés, ya que los metabolitos constituyen el último mecanismo de acción antes de cualquier consecuencia en el fenotipo y por tanto, nos permite conocer lo que ocurrió o está ocurriendo en este momento.

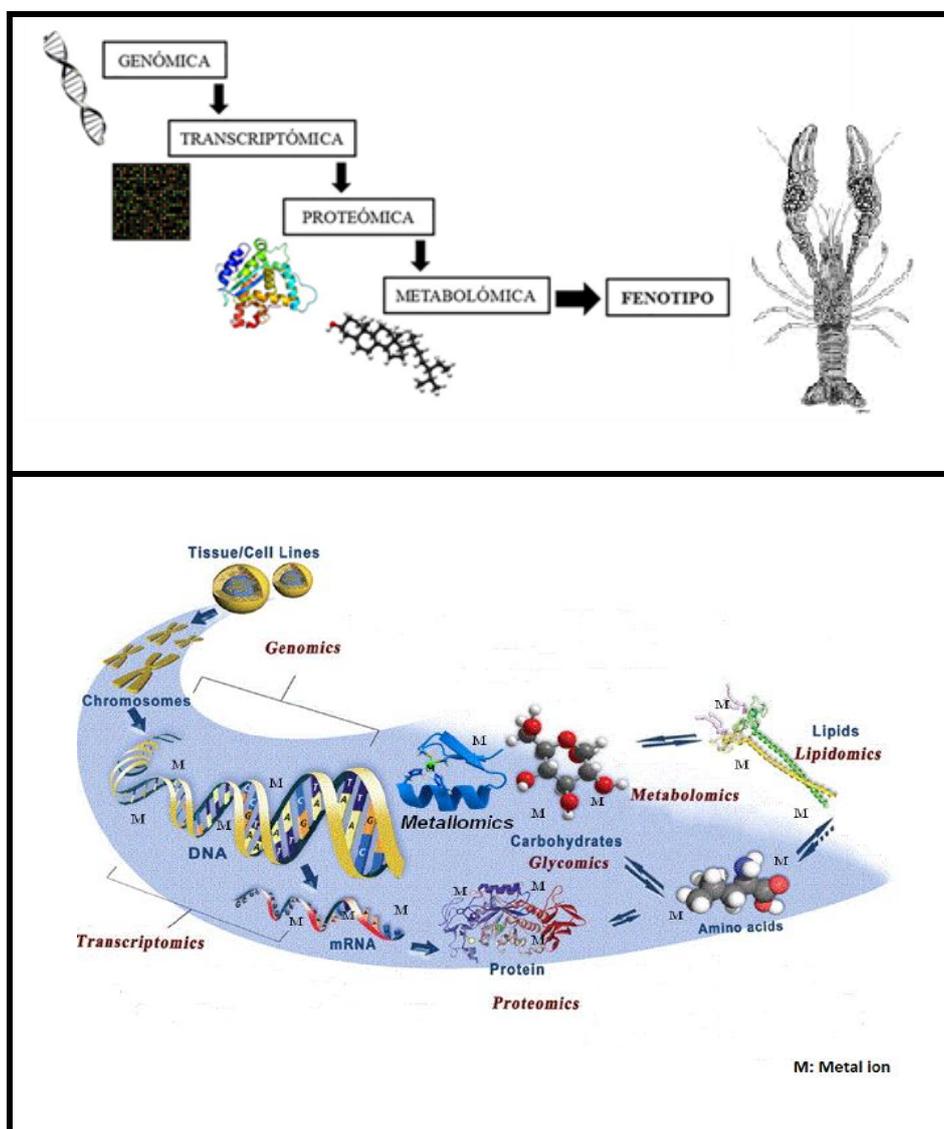


Figura 3. La cascada de las ómicas (arriba) y el esquema simplificado de un sistema biológico y ciencias -ómicas (abajo) [70].

INTRODUCCIÓN

La figura 3 muestra el esquema simplificado de un sistema biológico y las -ómicas que nos aportan información acerca del mismo. Generalmente las ómicas se encuentran interconectadas y puede hablarse de una cascada de información que fluye desde la genómica y transcriptómica, a la proteómica, metabolómica y finalmente la metalómica, como muestra la figura anterior. La metalómica y la metabolómica son las ómicas más recientes, la primera, por su vinculación con los metales, ha surgido como consecuencia del desarrollo de sensores para trazas metálicas muy sensibles como el ICP-MS, mientras que la segunda hace referencia a moléculas de pequeña masa molecular que desempeñan el mecanismo último de acción y funcionamiento en el organismo [71].

Así, mientras que la genómica nos informa sobre lo que un organismo puede hacer, la proteómica nos dice cómo puede hacerlo, y la metabolómica cómo el organismo, finalmente, funciona. Por otro lado, la metalómica puede considerarse a caballo de la proteómica y la metabolómica, ya que muchas proteínas son metaloproteínas y existen numerosos metabolitos con metales (metalo-metabolómica) [72].

La metabolómica y metalómica se desarrollan en los siguientes apartados de esta Tesis ya que constituyen una parte fundamental de la misma.

2.1. Metalómica.

La metalómica es fundamental para llevar a cabo el seguimiento de metales pesados en organismos vivos utilizando diferentes biomoléculas relacionadas con el estrés ambiental (biomarcadores) como metaloproteínas, enzimas redox y metabolitos [57], lo que va a constituir la base para el conocimiento del funcionamiento celular, de los tejidos e incluso del organismo.

Es importante destacar que aproximadamente un tercio de todas las proteínas requieren de la presencia de metales como cofactores para desarrollar su función (por ej., Cu, Zn, Fe, Mn) [73-74]. Estos metales son responsables de las propiedades catalíticas o estructurales de las proteínas y su presencia en las moléculas está determinada en muchos casos por el genoma [74]. Pero las proteínas tienen también otras funciones dinámicas en el control de la homeostasis de los metales y en determinadas funciones en las que el metal se une transitoriamente a la molécula.

Como ejemplo puede citarse al zinc, que actúa como cofactor en seis clases de enzimas y en proteínas de regulación celular [75]. Varias familias de proteínas de membrana transportan Zn (II) a través de las membranas hasta el interior de las células [71, 77], aunque la química intracelular y los mecanismos por los que el Zn (II) es detectado, almacenado, o incorporado como cofactor en las células no se conocen aún suficientemente. En este sentido, O'Halloran et

al [78] ha demostrado que la concentración total de cinc en las células permanece constante, lo que muestra la existencia de un preciso mecanismo de control de este elemento que hace indispensable la identificación *metaloproteínas* y otras moléculas en estrecha interacción con los iones metálicos.

Además, los iones metálicos pueden participar en la expresión de las proteínas, como ocurre con las metalotioneínas [79], unirse eventualmente, como ocurre con las metalochaperonas que son “escortas personales” de éstos, almacenándolos y transportándolos a los sitios de unión de otras proteínas [80-81], o las proteínas transportadoras extracelulares, como la albúmina y la transferrina que son fundamentales en el transporte global de los metales y su homeostasis [82].

La importancia de los metales en el mundo de las proteínas, y en general de la célula y de los seres vivos es por tanto fundamental. Por ello, junto a conceptos como el de “genoma”, relacionado con la información contenida en el núcleo y el de “proteoma” las numerosas proteínas por las que el organismo ejerce su función, es necesario también conocer la distribución de metales y metaloides en diferentes especies y compartimentos celulares, el “metaloma”, que constituye su complemento inorgánico. Por tanto, junto a conceptos como el de genoma y proteoma hay que añadir también el del metaloma cuando se estudian los procesos bioquímicos que se desarrollan en el interior de una célula [83].

Williams define el *metaloma* como la distribución de elementos, concentraciones en el equilibrio de iones metálicos o elementos libres, presentes en compartimentos celulares, células u organismos [84], y está relacionado con la identificación y/o cuantificación de metales/metaloides y sus especies [82, 85-87]. El significado del término metaloma que proponen se extiende a elementos metálicos y a las especies metálicas presentes en un sistema biológico, definido en cuanto a su identidad y/o cantidad. [85].

El metaloma aporta información acerca de:

1. Cómo un elemento (metal o metaloide), está distribuido entre los compartimentos celulares de un tipo dado de célula.
2. Su coordinación medioambiental, en qué biomoléculas está incorporado o con qué bioligando está complejado.
3. Las concentraciones de especies individuales de metal presentes.
4. La localización en el tejido o componente celular

INTRODUCCIÓN

Por todo ello, podemos definir la *metalómica* como el estudio cualitativo/cuantitativo del metaloma o conjunto de especies de metales o metaloides en una célula o tejido. Especies iónicas (ionoma) o complejos con proteínas (metaloproteoma). Y la *especiación* como el estudio cuantitativo/cualitativo de una o más especies químicas en un sistema [86]. Por ello, la *metalómica* considera que la identificación de un metal que actúa como cofactor en una proteína es clave para conocer su función y localizarla en el contexto de una ruta celular determinada [84].

El término metalómica es el objetivo de numerosas publicaciones científicas [72, 83, 88-89] y esto hace que hoy en día revistas como la Royal Society of Chemistry se haya involucrado en este campo con una revista dedicada únicamente a este campo (Metallogenics).

Sin embargo, la metalómica no relaciona las metaloproteínas, el contenido de metales y sus variaciones en la célula con el metabolismo. Esta aproximación metodológica es propia de la metabolómica, que considera el análisis de moléculas pequeñas o metabolitos relacionados con el funcionamiento de los organismos, asociando sus concentraciones y las variaciones que experimentan como consecuencia de cambios fisiológicos y genéticos [90]. Dentro de esta disciplina, la metalometabolómica [91], estudia los metabolitos que presentan un metal o metaloide en su estructura.

Estas ómicas emergentes que tienen en común el análisis de especies metálicas bien unidas a proteínas (metaloproteómica) o a metabolitos (metalometabolómica), son áreas específicas de la metalómica que tienen como origen la especiación química como muestra la figura 4.

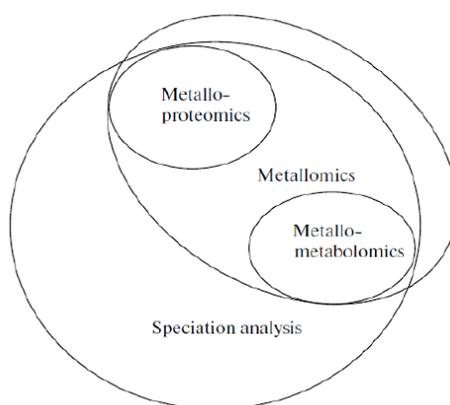


Figura 4. Relación entre el análisis de especiación, la metalómica y sus áreas específicas de bioanálisis [92]

Un problema importante es conocer la concentración del metal implicado, ya que numerosos elementos trazas endógenos en sistemas biológicos está por debajo o en el rango

sub-ng / g, y a su vez distribuido entre varias especies, en las que la contribución del metal al total de la estructura es insignificante en términos de peso. Este hecho, y la complejidad de la matriz, hacen que los límites de detección constituyan un reto analítico en este campo.

Sin embargo, el principal problema en el análisis de metaloespecies es la identificación mediante espectrometría de masas que precisa una gran pureza en la muestra, lo que implica una exhaustiva y compleja etapa de purificación. La mayoría de metaloespecies de interés, especialmente, aquellas con niveles trazas muy bajos o ultratrazas, no están todavía descubiertas. En otros casos las especies están en librerías, pero la disponibilidad de patrones de calibración es imposible. Algunas veces la baja estabilidad del complejo hace que la tarea analítica sea aún más exigente ya que la preparación de la muestra puede liberar el metal unido a la biomolécula.

2.1.1. Especiación Química y Metalómica

Según la IUPAC, un análisis de especiación química es la identificación y/o medida de las cantidades de una o más especies individuales en una muestra. Las especies químicas son las formas específicas de un elemento definidas por su composición isotópica, electrónica o estado de oxidación y/o complejo o estructura molecular [93]. La especiación química puede decirse que ha sido el origen de la metalómica y otras ómicas como la proteómica guiada por heteroátomos. Ésta última aborda el estudio del proteoma mediante MS utilizando la presencia de un heteroátomo para distinguir las proteínas unidas al heteroátomo (menos C, H, N, O) del resto de proteínas presentes.

Los estudios de especiación se han ido desarrollando durante los últimos 20 años, pudiendo encontrar métodos establecidos para análisis de rutina en medio ambiente, alimentos y estudios clínicos. La mayoría de los procedimientos en especiación están relacionados generalmente con el estado de oxidación de los elementos o el análisis de compuestos organometálicos antropogénicos y los productos de su degradación medioambiental como metilmercurio, alquilplomo, butil y fenilestaño.

Estas especies químicas individuales tienen un comportamiento diferencial en relación con su toxicidad, movilidad y biodisponibilidad. Un claro ejemplo sería el Hg, que en su forma orgánica como metilmercurio, presenta mayor toxicidad, siendo un compuesto neurotóxico capaz de concentrarse en el organismo (bioacumulación) y concentrarse así mismo en las cadenas alimentarias (biomagnificación). En el caso del arsénico se presenta la situación inversa, la toxicidad de los iones simples (As^{III} y As^{V}) disminuye, hasta que se elimina, cuando el elemento se incorpora en una molécula orgánica más compleja, como arsenobetaína (AsB).

INTRODUCCIÓN

La presencia de un enlace covalente metal-carbono asegura una estabilidad razonable del analito o analitos durante la preparación de la muestra. La situación es diferente cuando un analista está interesado en especies de metal endógenas y exógenas en sistemas biológicos [94-95] como sucede en los estudios metalómicos, en los que la complejidad de las moléculas se incrementa notablemente, y lo que es más importante, se trata, generalmente de especies desconocidas, para las que no se dispone de patrones o calibrantes que permitan su identificación y cuantificación. Así, mientras que en especiación se estudian, con frecuencia, especies organometálicas simples, en metalómica se estudia una gran variedad de ligandos que pueden coordinarse con elementos trazas.

Entre estos ligandos pueden citarse ligandos orgánicos pequeños (por ejemplo citrato, tartrato, oxalato o fitato, aminoácidos y oligopéptidos), moléculas macrocíclicas (por ejemplo, porfirinas) o macromoléculas (por ejemplo, polipéptidos, proteínas, fragmentos de restricción de ADN, polisacáridos), como se muestra en la figura 5.

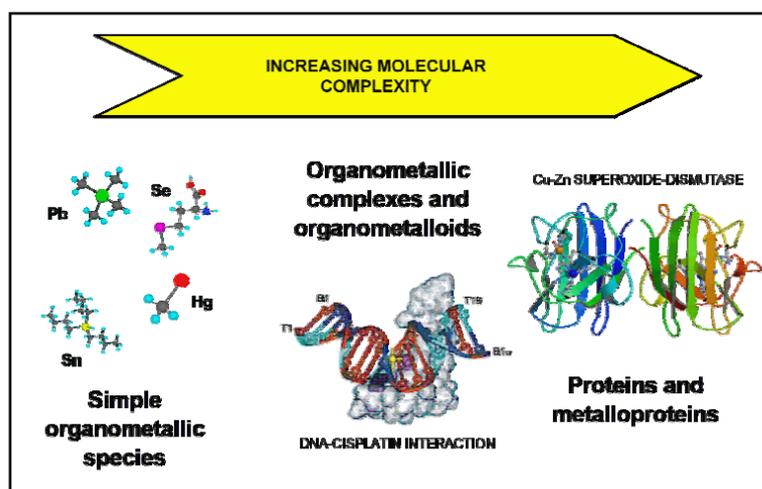


Figura 5. Esquema del incremento de la complejidad molecular en metalómica.

En especiación química, las especies metálicas objeto de estudio son, además de estables, como se ha comentado previamente, simples y conocidas *a priori*, por lo que es posible disponer de patrones comerciales lo que facilita extraordinariamente el análisis respecto al metalómico.

Entre los sistemas analíticos desarrollados para determinar metales pesados y sus especies, sin duda, las técnicas de absorción y emisión atómica han sido las más utilizadas, ya que son robustas y poseen límites de detección bajos (en el orden de los $\mu\text{g/L}$ a los mg/L). Dependiendo del sistema de atomización empleado estas técnicas son más o menos sensibles y

selectivas. Numerosos trabajos se han centrado en el análisis de metales pesados en muestras de agua en diversos ecosistemas acuáticos, usando absorción atómica de llama (AAS) [96-100]. No obstante, la tecnología de plasma acoplado inductivamente (ICP), es muy superior analíticamente, porque permite una buena atomización de la muestra, la eliminación de interferencias y la detección simultánea de varios analitos.

Diversos estudios de monitorización de la contaminación ambiental han comprobado la presencia de metales pesados en suelos, sedimentos, plantas y tejidos de animales usando técnicas de extracción de metales como la digestión ácida y técnicas de detección como la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) [101-102] o espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) [101-106]. La espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) también se ha usado para medir metales en aguas subterráneas como consecuencia de desastres accidentales [107]. Otra de las técnicas atómicas usadas para analizar metales pesados en sedimentos es la Emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE) [108].

Para la determinación de especies químicas, estas técnicas atómicas deben utilizarse de forma acoplada a una unidad de separación, que según la volatilidad puede ser un GC, HPLC o electroforesis capilar, pudiéndose alternativamente modificar la volatilidad de una especie mediante una etapa de derivatización previa al análisis.

Como se ha comentado previamente, la metabolómica se define como el estudio del conjunto de todos los metabolitos de un sistema biológico, también denominado metaboloma, y de los cambios metabólicos observados en respuesta a una perturbación genética o medioambiental. El metaboloma está compuesto por un elevado número de metabolitos intra- y extracelulares (moléculas biológicas con un peso molecular inferior a 1500 Da), los cuales participan directamente en los procesos metabólicos.

El análisis metabolómico puede clasificarse ya sea como “non-targeted” o no dirigido y específico o dirigido [109]. El análisis metabolómico “non-targeted” o no dirigido es un análisis cuantitativo no sesgado de todos (o un gran número) de metabolitos encontrados en una célula, tejido o fluido biológico [110]. Por otro lado, un análisis metabolómico dirigido analiza un grupo específico de metabolitos, tales como aminoácidos, lípidos, y otros [109].

Aunque se ha desarrollado un importante número de metodologías para observar los cambios en genómica, transcriptómica, proteómica y perfiles, a veces la información básica necesaria para realizar interpretaciones coherentes a partir de estos datos no está disponible [111]. Sin embargo, la estructura y función de la mayoría de los metabolitos están en la práctica bien caracterizadas y tal vez el número de metabolitos es inferior en número que los genes y las

INTRODUCCIÓN

proteínas; en este sentido, el genoma humano contiene alrededor de 30.000 genes, cerca de 100.000 proteínas y entre 2.000 y 20.000 metabolitos [112]. Además, los estudios metabolómicos se caracterizan normalmente por un número más pequeño de características, y un tamaño de muestra mayor que se puede usar, lo que permite a la metabolómica ser mucho más potente en la detección estadística de respuestas en comparación con tecnologías basadas en genómica o proteómica [113].

El papel central que los metabolitos juegan en la biología de sistemas confiere una serie de ventajas a la metabolómica frente a otras ciencias ómicas, las cuales pueden resumirse en los siguientes puntos [114]:

La metabolómica es el indicador más fiable del fenotipo de un organismo, ya que los metabolitos representan el punto final de las reacciones bioquímicas, reflejando directamente las interacciones entre la expresión génica, las proteínas y el medioambiente. Los cambios en el metaboloma son generalmente más acusados que los observados en otros niveles biológicos como el transcriptoma o el proteoma, lo que repercute en una mayor sensibilidad. El elevado dinamismo del metaboloma lo convierte en un indicador instantáneo de las perturbaciones que ocurren en el organismo. La metabolómica permite estudiar los cambios asociados a los procesos de control fisiológico y metabólico, ya que muchos metabolitos están implicados en las modificaciones post-transcripcionales de las proteínas (*e.g.* ATP, acetil-coenzima, glucosa). Las técnicas metabolómicas pueden aplicarse en múltiples compartimentos biológicos del organismo estudiado (*e.g.* tejidos, fluidos biológicos), simplemente cambiando el procedimiento de preparación de muestra, lo cual permite investigar de forma global las perturbaciones metabólicas. El coste y tiempo de análisis es por lo general menor en metabolómica que en otras técnicas ómicas.

No obstante, la metabolómica es aún una ciencia emergente con algunas limitaciones importantes. El principal reto de la metabolómica es el desarrollo de metodologías capaces de determinar el mayor número posible de metabolitos en un solo análisis. Mientras que los análisis genómicos, transcriptómicos y proteómicos están dirigidos a moléculas con una gran analogía estructural, por lo que el metaboloma presenta una gran complejidad que dificulta su medición e identificación [115]. En primer lugar cabe destacar la heterogeneidad química de los metabolitos presentes en cualquier muestra biológica, entre los que pueden encontrarse lípidos, ácidos orgánicos, alcoholes y otros muchos compuestos. Además, el metaboloma está compuesto por metabolitos procedentes de diversas fuentes, incluyendo metabolitos endógenos (sintetizados y metabolizados en el organismo), exógenos (por ejemplo: fármacos, nutrientes), así como metabolitos procedentes de la interacción entre distintos organismos (por ejemplo: microflora intestinal). Esta diversidad composicional resulta en una gran variabilidad de propiedades físico-químicas, incluyendo masa molecular, polaridad (hidrofobicidad-

hidrofilidad), propiedades ácido-base o volatilidad, lo cual implica la necesidad de múltiples enfoques metabolómicos complementarios para obtener una cobertura analítica completa. Otro factor importante es el amplio rango de concentraciones en que se pueden encontrar los metabolitos (desde pM a mM), lo cual dificulta la determinación simultánea de todos ellos. Por último, el dinamismo del metaboloma también debe tenerse en cuenta a la hora de diseñar un experimento metabolómico ya que los perfiles metabólicos sufren de una alta variabilidad temporal (por ejemplo: cambios diurnos) e interindividual, en la que intervienen numerosos factores como el sexo, la edad o la dieta.

A pesar de estas limitaciones, la metabolómica ha demostrado una gran aplicabilidad en numerosos campos gracias a su potencial para caracterizar fenotipos complejos afectados por diversas condiciones anormales. Así, algunas de las aplicaciones más relevantes son el estudio de los mecanismos de acción de tóxicos [116-117], la metabolómica medioambiental [118], y las aplicaciones biomédicas relacionadas con el estudio de los mecanismos subyacentes a la patología de las enfermedades, el descubrimiento de posibles biomarcadores y el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos [119].

2.1.2. Metabolómica ambiental

La metabolómica ambiental es la aplicación de la metabolómica para caracterizar las interacciones de los organismos con su ambiente. Así, el número de aplicaciones que la metabolómica está encontrando para las ciencias del medio ambiente va en aumento, desde entender las respuestas de los organismos a presiones abióticas hasta sus respuestas hacia otros sistemas vivos. Esas interacciones pueden ser estudiadas desde individuos hasta poblaciones, que pueden ser relacionadas a los campos tradicionales de la ecofisiología y la ecología, y pueden abarcar desde efectos instantáneos hasta aquellos en escalas de tiempo evolutivas, permitiendo así estudios de adaptación genética [120].

Los estudios basados en metabolómica ambiental pueden ser utilizados para:

- descubrir el modo de acción (MOA) de metales tóxicos a través de experimentos controlados de laboratorio
- evaluar la toxicidad (respuesta adversa a una sustancia biológica), que pueden ser útiles en la evaluación del riesgo
- y para desarrollar nuevos biomarcadores (basado en cambios en el metaboloma descubiertos a través de experimentos controlados de laboratorio) que se pueden aplicar en el biomonitoreo ambiental (un escenario más realista del medio ambiente).

INTRODUCCIÓN

En general, el objetivo de esta metodología es encontrar biomarcadores que nos permitan evaluar el estado fisiológico real de un organismo. La figura 6 muestra la evolución del número de publicaciones sobre metabolómica ambiental desde 2001; como puede observarse ha habido un aumento significativo de publicaciones relacionadas con la metabolómica ambiental.

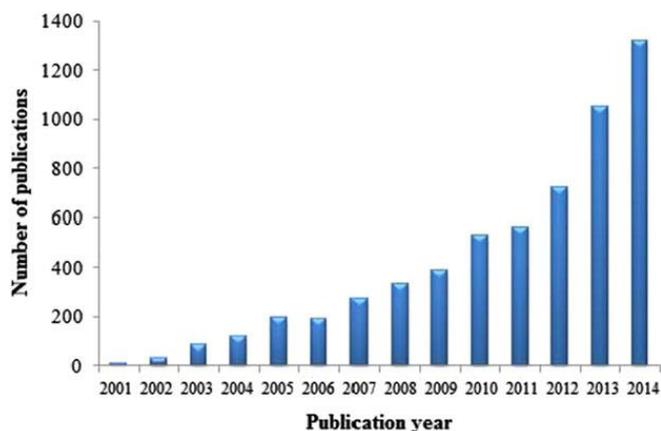


Figura 6. Evolución de las publicaciones sobre metabolómica ambiental desde 2001 [121]

Esta subdisciplina de la metabolómica, la metabolómica medioambiental, requiere técnicas analíticas con una alta sensibilidad, especificidad y capacidad para la identificación de moléculas, que además son accesibles para la mayoría de los laboratorios, como MS que junto la resonancia magnética nuclear (RMN) son las más comunes herramientas utilizadas en análisis metabolómicos [122]. Además, los avances tecnológicos en instrumentación analítica están proporcionando nuevas alternativas instrumentales para investigar los metales en profundidad, y generar una comprensión más completa de las interacciones entre los metales y las células.

Hasta la fecha se han llevado a cabo numerosos estudios de exposición controlada a elementos tóxicos, siendo la toxicometabolómica una aproximación interesante en el campo medioambiental. En esta Tesis, se ha medido la respuesta metabolómica de organismos centinela (como el cangrejo *Procambarus clarkii*) en ecosistemas afectados por contaminación por metales y se han realizado experimentos de exposición a fármacos en otros biondicadores invertebrados (como la almeja *Ruditapes philippinarum*). Los metabolitos de los diferentes órganos y fluidos biológicos se han extraído en dos etapas; por un lado los metabolitos polares usando como extractante una mezcla metanol/agua (80:20) y por otro lado, aquellos que presentan naturaleza lipofílica usando como extractante en este caso una mezcla cloroformo/metanol (50:50). Los metabolitos se analizaron mediante infusión directa a un espectrómetro de masas híbrido, DI-ESI-QqQ- TOF-MS. Finalmente, los metabolitos responsables de la clasificación se identificaron tras un análisis discriminante (PLS-DA),

utilizando como variables las m/z obtenidas en el espectro de masas, con ayuda de las bases de datos y la espectrometría de masas en tándem relacionarlas con los metabolitos.

3. BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN SISTEMAS ACUÁTICOS

El medio ambiente acuático incluye a los organismos de la columna de agua (con los organismos planctónicos y pelágicos) y de sustrato (con los organismos bentónicos y demersales), y se encuentra en sistemas dulceacuícolas lénticos (lagos) y lóticos (ríos), estuarinos (lagunas costeras) y marinos (plataforma continental).

Las causas principales de perturbación ambiental en estos ambientes incluyen entre otros, como se ha comentado anteriormente, la temperatura elevada, el pH elevado o reducido, condiciones de hipoxia y anoxia, sustancias tóxicas (insecticidas, cadmio, níquel, vanadio, metales pesados, ácido sulfhídrico), hidrocarburos y materia orgánica.

Los cambios en los parámetros físico-químicos normales en un ambiente acuático afectan la estructura y función de las comunidades florísticas y faunísticas del bentos, resultando de una composición comunitaria diferente de la normal. De aquí surgen las especies indicadoras, indicadores biológicos o *bioindicadores*. La denominación de una especie como bioindicadora requiere de un conocimiento previo respecto a la composición comunitaria bajo condiciones normales, incluyendo el ciclo de vida de las especies, su estacionalidad y sus variaciones naturales, de manera que sea posible comparar las condiciones antes y después de una perturbación ambiental.

Las especies indicadoras cumplen con las siguientes características:

- tienen tolerancias ambientales estrechas,
- presentan una gran abundancia, al tiempo que se registra la ausencia de otras especies que bajo condiciones normales estarían presentes,
- presentan una relación entre la concentración del contaminante en sus tejidos y la concentración del contaminante en el ambiente,
- son sedentarias,
- tienen una distribución amplia para facilitar comparaciones,
- tienen una permanencia larga que permita registrar el efecto del contaminante a largo plazo,

INTRODUCCIÓN

- tienen una variabilidad genética y ecológica baja,
- tienen características biológicas y ecológicas conocidas,
- son adaptables a estudios de laboratorio.

Los bioindicadores incluyen a las bacterias, rotíferos y protozoarios, las micro y macroalgas (briozoarios, nematodos, anélidos, crustáceos, moluscos e insectos) y los anfibios, la mayoría de los cuales forman parte de las comunidades bentónicas.

De entre los bioindicadores disponibles de áreas costeras y estuarinas en esta Tesis se han seleccionado los moluscos bivalvos de las especies *Scrobicularia plana* (de vida libre) y *Ruditapes philippinarum* (para condiciones de ensayo de laboratorio) y el crustáceo *Procambarus clarkii* (de vida libre). Los moluscos bivalvos son ampliamente conocidos por su capacidad de acumular altos niveles de numerosos contaminantes en sus tejidos. Esta es una de las razones por las que se emplean habitualmente como especies centinela o bioindicadores en los programas de vigilancia de la contaminación acuática.

Las zonas naturales donde se localizan, los estuarios, son consideradas como entornos biológicos de alto riesgo, por ser áreas ambientalmente sensibles a la contaminación y a la alteración de variables físicas como la Tª, salinidad, pH y oxígeno disuelto. Estos organismos bentónicos habitan en sedimentos de estuario/marinos en los que se ha producido una grave degradación como consecuencia del incremento de la actividad humana, ocasionada por la revolución industrial durante el siglo XX [123].

En los estuarios los niveles de toxicidad son consecuencia de una gran variedad de productos químicos procedentes de las actividades industriales, urbanas, agrícolas y marítimas que provocan que sus efectos se puedan acumular. También el amplio desarrollo costero ha ocasionado su fragmentación causando la interrupción del patrón de circulación natural. Estos hechos hacen que los estuarios sean cada vez más inadecuados para la fauna y flora.

A pesar de los esfuerzos para limitar la cantidad de vertido a las aguas costeras y de transición a través de la convención OSPAR (Oslo and Paris Conventions) o la WFD (Water Framework Directive), estos inputs siguen deteriorando la calidad de los ecosistemas marinos, potenciando la necesidad de desarrollar herramientas toxicológicas que permitan entender cómo los organismos interaccionan con los contaminantes en su medio natural y determinar los riesgos sanitarios, ambientales y humanos posibles [124].

La evaluación del riesgo ambiental en estas zonas, y más concretamente el análisis del riesgo, se realiza a partir de ensayos de toxicidad o bioensayos, que ante diferentes fuentes de estrés ambiental, proporcionan información sobre la biodisponibilidad, efectos adversos y

relación dosis-respuesta. Los bioensayos posibilitan la detección de respuestas biológicas a distintos niveles de organización (desde nivel molecular hasta nivel de comunidad) originadas por la exposición de un organismo a un determinado contaminante o una combinación de varios, permitiendo evaluar la biodisponibilidad de los mismos y su potencial tóxico.

Existen varias razones por las que los invertebrados, y en particular los moluscos bivalvos, son preferibles como especies bioindicadoras para la evaluación del riesgo ecológico frente a los vertebrados. La primera de ellas es su elevada abundancia, constituyen el 95 % de todas las especies de animales, lo que origina que los invertebrados sean los componentes principales de los ecosistemas, siendo sus poblaciones tan numerosas que la toma de muestra no supone una variación significativa en la dinámica poblacional. Además, su extensa distribución, su estilo de vida sedentaria y su facilidad de recolección hacen que, por todos estos motivos, los moluscos bivalvos sean candidatos idóneos en los procesos de ERA (evaluación del riesgo ecológico o ambiental) en el medio ambiente marino [125].

LOS MOLUSCOS BIVALVOS

La clase bivalvo pertenece al filo mollusca, que son invertebrados más numerosos después de los artrópodos, que se caracterizan por poseer el cuerpo aplanado lateralmente y una concha con dos piezas o valvas, que lo cubre completamente. Las valvas están unidas por un ligamento que junto a la «charnela», funciona a modo de visagra, y permite la apertura de la concha, por medio de la acción de los músculos aductores (anterior y posterior). El manto, es una epidermis en forma de lámina que «cuelga» del cuerpo del organismo protegiendo las partes blandas y creando una cavidad en la que se encuentra la masa visceral. El manto es el encargado de la secreción de la concha. El borde del manto contribuye al crecimiento en diámetro de la concha, mientras que la zona interna se encarga del crecimiento en grosor (figura 7)

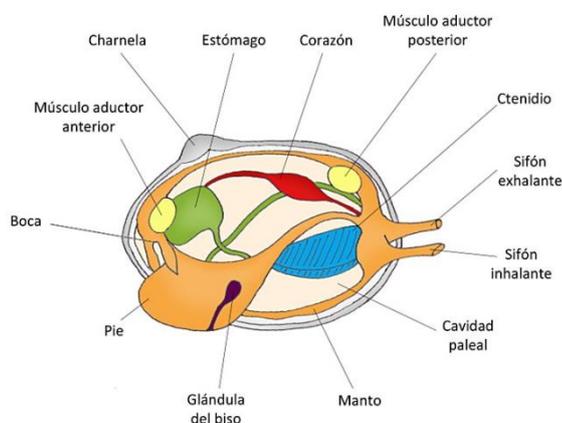


Figura 7. Anatomía interna de un molusco bivalvo

INTRODUCCIÓN

LOS CRUSTÁCEOS

Los crustáceos son un extenso subfilo de artrópodos. Los artrópodos presentan un exoesqueleto de quitina endurecido por sales cálcicas y apéndices articulados. Tienen el cuerpo dividido en segmentos y en regiones; los segmentos también están articulados entre sí. Además, tienen mudas periódicas del exoesqueleto que, en algunos casos, se acompañan de metamorfosis. En concreto, el cangrejo de río pertenece al orden decápodo, éstos cumplen una gran variedad de papeles ecológicos en océanos, lagos y ríos donde habitan, como también en ambientes terrestres y semi-terrestres húmedos.

Los crustáceos son acuáticos, respiran por branquias situadas en la base de los maxilípedos y pereiópodos. Tienen el cuerpo dividido en dos regiones: cefalotórax (cabeza y tórax), y abdomen. Tienen un rostro, o prolongación anterior de la cabeza, más o menos desarrollada. Y por último ojos compuestos y pedunculados. El cangrejo de río posee un cefalotórax compuesto por un par de anténulas birrameas, un par de antenas unirrámeas, un par de ojos compuestos, apéndices bucales y 5 pares de patas locomotoras o pereiópodos (el primer par acabado en pinza). El abdomen está compuesto por un par de pleópodos por segmento (excepto en el penúltimo y último segmento). El caso de los machos los pleópodos son pequeños excepto en el primer par y el segundo par que son apéndices copuladores, y para la hembra los pleópodos son mayores y plumosos. También por un par de urópodos en el penúltimo segmento del abdomen (la aleta caudal, urópodos y telson).

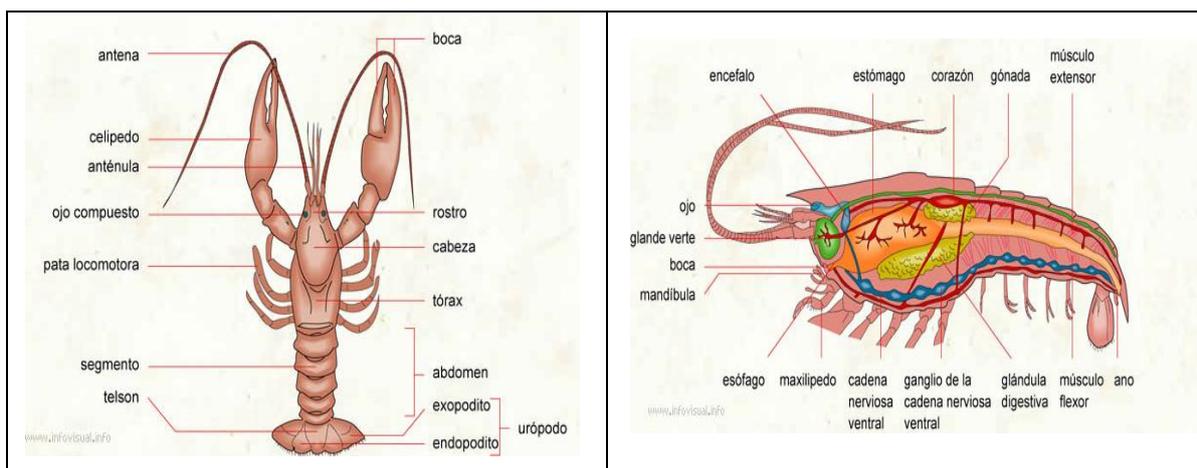


Figura 8. Morfología y anatomía interna de un cangrejo de río

3.1. *Scrobicularia plana* como bioindicador

En concreto la almeja *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) (figura 9) ha sido una herramienta útil, como podemos observar en la bibliografía, para evaluar la bioacumulación de contaminantes durante la vida útil del animal.

La denominación más frecuente de las obtenidas es *coquina de fango*, nombre que alude al hábitat característico de la especie, el fango pegajoso y cremoso característico de zonas húmedas de elevada sedimentación. Vive en el intermareal, enterrada en el sustrato en zonas de mareas en lugares de salinidad variable, como rías y estuarios. Está ampliamente distribuida desde Noruega al Mediterráneo y al Oeste de África.



Figura 9. Ejemplares de *Scrobicularia plana*. Río Guadalquivir (Bonanza) - 2005. (Fuente: A. M. Arias, Ictioterm, 2005)

Un ejemplo es un estudio donde se han medido concentraciones de metales (Co, Hg, Mo, Ni y Zn) en conchas en las estaciones del estuario del Guadalquivir que han sido afectadas por el derrame de la mina de Aznalcóllar [126]. Se observó que el nivel de estos cinco elementos se redujo de 1999-2007, lo que sugiere que el efecto del accidente de la mina se ha visto disminuido. Sin embargo, el contenido de metales en los tejidos blandos no siguió la misma tendencia decreciente que indica que los tejidos blandos presentan una diferente capacidad de acumular metales del medio ambiente.

INTRODUCCIÓN

Otros ejemplos donde se ha usado *Scrobicularia plana* como bioindicador son otros trabajos sobre los efectos adversos provocados por metales traza en estuarios [127-128]. En ellos se abordaron los factores de bioacumulación relacionadas con cada metal y la influencia de la salinidad. Bajo condiciones empleadas en bio-ensayos donde se puede inferir cómo son los mecanismos de bioacumulación de Zn y Cd a valores altos de salinidad, así como el mecanismo de bioacumulación de Pb y Cu en estos bivalvos y la inducción de metalotioneínas.

3.2. *Ruditapes philippinarum* como bioindicador

Entre las diferentes clases de bivalvos el género *Ruditapes*, más concretamente sus especies *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*, se han empleado con éxito en todo el mundo como monitores biológicos de presiones antropogénicas, o bioindicadores [129-130].

Ruditapes philippinarum (Adams y Reeve, 1850) (figura 10), comúnmente conocida como *almeja japónica*, es una especie endémica de la región Indo-Pacífica. Fue introducida en el Atlántico norte y en el Mediterráneo a principios del 1970 con fines comerciales [131]. Es infaunal y epibentónica (pueda vivir tanto en el interior del sedimentos como en su superficie) lo que condiciona su modo de alimentación y las características de la dieta natural. Su posición en la cadena trófica marina, hace que sean un punto unión entre los productores primarios, otros invertebrados y depredadores superiores. Se encuentra entre los bivalvos más explotados del mundo, adquiriendo una considerable importancia económica tanto en términos de acuicultura como fuente de recurso natural [132-135]. Sus hábitats y requerimientos son similares, no solamente compiten en la producción acuícola, sino también en los hábitats naturales [133]



Figura 10. Ejemplares de *Ruditapes philippinarum*. Mercado Municipal de Cádiz-2005. (Fuente: A. M. Arias, IctioTerm, 2005)

Aunque se ha descrito ya la sustitución de *Ruditapes decussatus* por *Ruditapes philipinarum* en diferentes ecosistemas [136], ambas especies han sido utilizadas en bioensayos como especies bioindicadores en distintas fases de su ciclo de vida, desde estadio larvario [137], juvenil [138] hasta adulto [140], con el fin de desarrollar una herramienta idónea que garantice el análisis del riesgo ambiental en los ecosistemas costeros y de transición (estuarios).

Como se ha descrito anteriormente, no solo la contaminación antropogénica constituye una fuente de estrés ambiental en ecosistemas de estuario, costeros y marinos sino también, la intensificación y el aumento de la frecuencia de episodios extremos climáticos. El cambio climático representa una especial amenaza para especies nativas de estuario, como *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philipinarum*, debido a que su capacidad de dispersión hacia zonas más favorables se verá limitada [141]. El calentamiento global además de afectar a la temperatura del agua, origina cambios en el rango de las variables físicas claves (pH, T^a, salinidad, oxígeno disuelto etc.) [141]. Por ejemplo, el aumento de las temperaturas puede modificar indirectamente la salinidad del medio natural al incrementarse la frecuencia y la severidad de las tormentas, por la fusión de los casquetes polares y el aumento del nivel del mar, mediante la alteración de la circulación termohalina y el aumento de evaporación. En este sentido se manifiesta que el destino de las comunidades en el estuario puede depender de la capacidad de los organismos de tolerar y adaptarse a esta combinación de factores físico-químicos, de estrés biótico y a la disminución en la disponibilidad de hábitat.

Por tanto, se hace necesario un análisis crítico sobre la investigación realizada con especies bioindicadoras tales como *Ruditapes sp*, utilizadas en las últimas décadas en procesos de ERA, con el objeto de estudiar su idoneidad a la hora de afrontar nuevos retos en lo que se refiere a nuevos contaminantes antropogénicos (contaminantes emergentes) y otras fuentes de estrés ambiental en el marco del cambio global. Por esta razón se considera importante profundizar en el uso de *Ruditapes sp* para la evaluación del riesgo ambiental en sistemas litorales y marinos.

Un ejemplo sobre el uso de esta especie como bioindicador es en experimentos de exposición a fármacos donde se evalúa el estado de los organismos expuestos a concentraciones ambientales [142] como una herramienta de detección para la evaluación de la contaminación por los productos farmacéuticos en ambientes marinos.

3.3. *Procambarus clarkii* como bioindicador

El cangrejo rojo *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (figura 11), también llamado cangrejo de las marismas o cangrejo de Louisiana es una especie con gran capacidad colonizadora, como pone de manifiesto el hecho de que hoy en día puede ser encontrado

INTRODUCCIÓN

prácticamente en cualquier lugar del mundo, a pesar de que su origen geográfico se circunscribe a una concreta zona fronteriza entre Estados Unidos de América y México. Esta dispersión actual de la especie se fundamenta en la capacidad competitiva que caracteriza al cangrejo rojo, pero no habría tenido lugar si no hubiera actuado el ser humano como vector de transmisión.



Figura 11. Ejemplar de *Procambarus clarkii*. Río Guadalquivir
(Corta de La Cartuja) (Fuente: A. M. Arias, Ictiaterm, 2005)

El poder competitivo del cangrejo rojo como especie invasora frente a las especies nativas de cangrejo de río se basa en una mayor capacidad para soportar condiciones adversas del medio (escasez de oxígeno disuelto en el agua, elevadas temperaturas, etc), una madurez sexual más precoz (gracias al rápido crecimiento que experimentan los ejemplares de esta especie, al año de edad tanto machos como hembras ya son capaces de reproducirse), una capacidad reproductiva sensiblemente mayor (el número de huevos por puesta de la hembra oscila entre los 200 y los 700, mientras que en el cangrejo autóctono la media es de unos sesenta huevos por hembra, y además, se han registrado casos de más de una puesta anual para una misma hembra de cangrejo rojo, fenómeno este que no sucede en el caso de la especie indígena), y una capacidad de dispersión natural muy elevada (en condiciones adecuadas, los cangrejos rojos son capaces de realizar largas caminatas fuera del agua, a la búsqueda de nuevas zonas en las que establecerse).

La primera introducción de esta especie de cangrejo en el estado español data de hace treinta años, y fue promovida por el archiduque Andrés Salvador Habsburgo Lorena, quien en 1973 ordenó la distribución de unos 100 Kg. de cangrejos rojos, procedentes de Norteamérica, en los arrozales de su finca “Malpartida”, sita en la provincia de Badajoz. Posteriormente, se importaron otros 500 Kg. de cangrejos de las marismas desde el estado norteamericano de Louisiana, de los que solo sobrevivieron una quinta parte. La suelta se realizó el 10 de Mayo de

1974, en la localidad sevillana de Puebla del Río. A pesar de esta mortandad inicial, los ejemplares supervivientes se aclimataron de tal modo a su nuevo hábitat que, a los dos años de la suelta, ya se pudo realizar la primera captura y comercialización de cangrejos en el mercado.

La noticia de la llegada de los cangrejos rojos y de la rentabilidad económica que producían se difundió muy rápidamente, y fueron los propios pescadores quienes se encargaron de distribuir esta especie por toda la zona arroceras del bajo Guadalquivir, apareciendo entonces las consiguientes disputas entre pescadores y arroceros. Los primeros se dedicaban a expandir el área habitada por el cangrejo rojo, y su pretensión era que ninguna zona susceptible de albergar poblaciones del crustáceo se quedara sin ellas, mientras que los agricultores con cultivos de arroz observaban cómo la presencia de esta especie afectaba gravemente a sus explotaciones, más por el deterioro que las galerías construidas por los cangrejos provocaba en los azudes y demás barreras para la retención del agua (con lo que las fincas se secaban y se perdía la cosecha), que por lo que los cangrejos pudieran consumir directamente.

Estas primeras sueltas se hicieron, como ya hemos dicho, en arrozales, donde el cangrejo rojo encontró un caldo de cultivo inmejorable, pero desde allí se extendió a marismas, ríos y embalses, tanto “ayudado” por nuestra especie como de manera independiente, llegando a establecerse en prácticamente toda la geografía peninsular en apenas quince años. La rapidez de esa expansión se justifica por múltiples razones: la desaparición del cangrejo autóctono, como consecuencia de la afanomicosis o peste del cangrejo, había dejado vacante un nicho ecológico que podía ser ocupado con facilidad por el cangrejo rojo, los comportamientos colonizadores y la gran capacidad competitiva característicos de esta especie ayudaron a acelerar el proceso de expansión, y la irresponsabilidad de algunos humanos que, por razones egoístas e ignorando el grave problema que estaban causando, se dedicaron a introducir el cangrejo rojo en zonas a las que, por medios naturales, jamás habría llegado o habría tardado mucho más tiempo en llegar. En efecto, al igual que sucedió con los pescadores profesionales en los primeros años tras la introducción del cangrejo rojo en la provincia de Sevilla, en el resto de la península se fueron multiplicando los nuevos focos con cangrejo rojo por parte de los aficionados a la pesca de cangrejos que, seguramente desconocedores del daño que estaban haciendo, se ocuparon de “repoplar” los ríos en los que antaño disfrutaban de su afición con aquello que tenían más a mano, ya que la tradición gastronómica indicaba que los cangrejos de río debían ser cocinados “en vivo” y, por tanto, las pescaderías comercializaban los cangrejos vivos procedentes del sur peninsular.

La introducción de algunas especies crustáceas ha producido alteraciones de agua dulce ambientes y disminuciones de especies nativas en todo el mundo. El cangrejo rojo, se

INTRODUCCIÓN

introdujo produciendo graves impactos en la agricultura del arroz y en la biota nativa como macrófitos, gasterópodos, cangrejo autóctono y anfibios.

El cangrejo *Procambarus clarkii*, que tiene un ciclo de vida largo, amplia distribución y puede estar en una amplia gama de condiciones ambientales; se ha sugerido como bioindicador para controlar la contaminación. El cangrejo se introdujo en las marismas del río Guadalquivir colonizando rápidamente el ecosistema acuático y alcanzando el ecosistema acuático del Parque Nacional de Doñana (DNP) [143]. El Parque Nacional, que es un (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura) de la UNESCO Reserva de la Biosfera, sin embargo, no está libre de riesgos, al estar situado cerca de la Faja Pirítica Ibérica que genere drenaje ácido de mina y de las zonas industriales en Ría de Huelva. Además, se vio afectada por el vertido minero de Aznalcóllar en el estuario del Guadalquivir en 1998. Todo esto hace necesaria la realización de un seguimiento regular de la calidad del medio ambiente basado en el análisis de los contaminantes y las respuestas biológicas a ellos.

En este sentido, el cangrejo *Procambarus clarkii* se ha propuesto anteriormente para evaluar la contaminación en el Parque Nacional de Doñana utilizando biomarcadores convencionales [144], y también en esta Tesis se le ha dado un enfoque metabolómico para la evaluación de la contaminación de esta zona, teniendo en cuenta la respuesta biológica de este organismo a la contaminación. Además, se determinó la acumulación de metales en los tejidos de cangrejo. Por lo tanto, el análisis integrado de los datos metabolómicos y metalómicos permitió el estudio de la respuesta metabólica del organismo [69].

4. BIOMARCADORES

4.1 Concepto de biomarcador

Como se comentó en apartados anteriores el impacto de los contaminantes en los ecosistemas se evalúa por diferentes metodologías: i) valoración físico-química, estableciendo umbrales de concentración para algunas sustancias tóxicas o indicadoras de calidad y ii) análisis de diversos parámetros biológicos (biomarcadores) cuya alteración respecto a las condiciones naturales indica una perturbación del ecosistema.

Sin embargo, los efectos de un vertido en una comunidad pueden persistir mucho después que los parámetros físico-químicos hayan vuelto a la normalidad (los ecosistemas necesitan tiempo para recuperarse). Así, los análisis químicos tienen limitaciones, es necesario conocer previamente los contaminantes buscados, tienen una sensibilidad limitada (a veces superior a las concentraciones que afectan los organismos), posibles interferencias, y no informan sobre los efectos biológicos de los contaminantes [23]. Mientras un análisis físico-químico puntual sería una 'fotografía' del estado de un ecosistema y habría que realizar un seguimiento continuado para obtener una visión más amplia de la calidad ambiental, el análisis bioquímico sería una 'película' de lo sucedido desde un tiempo determinado hasta la fecha. De hecho, algunos procesos de contaminación se detectan mejor por un seguimiento biológico [145].

Según la definición ya clásica de McCarthy & Shugart (1990), los biomarcadores son "medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, y que indican que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante". Es decir, solo consideramos biomarcadores a las medidas realizadas en los niveles molecular y celular de organización biológica, ya que es en estos niveles donde ocurre la interacción inicial de los contaminantes con los organismos y en base a los cuales podremos desarrollar medidas sensibles que sirvan como señales de alarma temprana de efectos en los niveles superiores de individuo, población o ecosistema [146-147].

Los biomarcadores son parámetros biológicos medidos en los organismos bioindicadores, que indican, al alterarse sus niveles, la exposición a estos contaminantes, sus efectos biológicos o los riesgos de su presencia en los ecosistemas [23, 148-149]. Estos parámetros se usan en programas de biomonitorización, en los cuales el programa de muestro es se hace muy cuidadosamente, para poder obtener conclusiones

INTRODUCCIÓN

válidas estadísticamente. También se debe tener cuidado al escoger la(s) especie(s) a monitorear, así como los biomarcadores a emplear. Esto debe hacerse en base a la experiencia en el área de estudio, y a las posibles fuentes de contaminantes presentes en la región.

La biomonitorización tiene como objetivos: i) Vigilar a largo plazo zonas afectadas o libres de contaminación. ii) Evaluar riesgos en zonas de vertido frecuente. iii) Implantar medidas reguladoras y estándares ambientales. iv) Comprobar la efectividad de las medidas correctoras tras episodios de contaminación.

Este concepto de biomarcador se fundamenta en que para que los efectos de los contaminantes sean evidentes en el ecosistema, el primer nivel de interacción es el molecular-celular (**figura 12**). Este nivel de organización es además el ideal para estudiar relaciones causa-efecto y los mecanismos de acción de los contaminantes. Así, la propuesta o desarrollo de un biomarcador debe basarse en el conocimiento del mecanismo de respuesta del mismo. Es fundamental que el tiempo de respuesta del biomarcador sea corto (horas, días), de forma que éste pueda ser utilizado como "sistema de alarma temprano" y puedan tomarse medidas de reparación antes de que el ecosistema se vea afectado. Si, además, el biomarcador muestra valor diagnóstico, éste podrá ser entonces utilizado de forma predictiva.

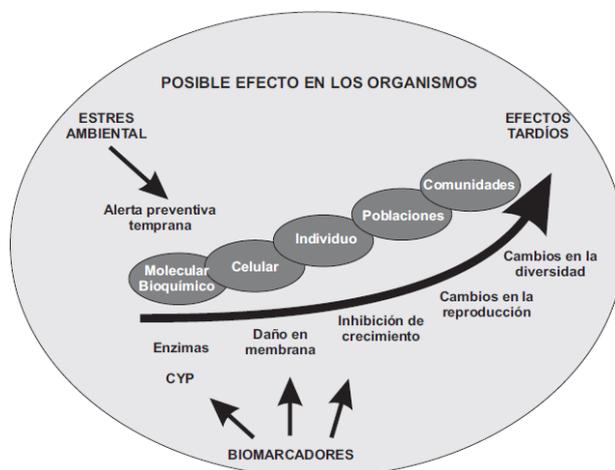


Figura 12. Biomarcadores a diferentes niveles de organización biológica, y diferentes escalas temporales.

Todo lo contrario ocurrirá cuando el efecto sea detectado en los mayores niveles de organización, donde los cambios en la diversidad o en la reproducción serán difíciles de remediar y en algunos casos los daños serán irreversibles. Generalmente cuando se detectan efectos a este nivel ya es obvio que hay un problema.

Los moleculares son alertas tempranas, pues se alteran antes que los ecosistemas sufran daños irreversibles. Aquellos a nivel de población, comunidad o ecosistema tienen mayor

relevancia toxicológica, pero responden de forma más lenta [23, 148-150]. En la tabla 1 se indican algunos ejemplos de biomarcadores pertenecientes a distintos niveles de organización y los tipos y tiempos de repuestas biológicas a que dan lugar.

Biomarcador	Respuesta biológica	Nivel de organización	¹ Aparición	Nivel de detección
Daño al DNA	Formación de aductos	Molecular	Temprana	Bajo
Metabolitos	Xenobióticos	Molecular	Temprana	Bajo
Enzimas antioxidativas	Defensa contra estrés oxidativo	Molecular	Temprana	Moderado
Colinesterasa	Inhibición enzimática	Molecular	Temprana	Moderado
Biosíntesis de hemo	Porfirinas anormales	Molecular	Media	Moderado
Otras actividades / relación AMP:ATP relación RNA:DNA	Disfunción metabólica	Molecular	Temprana	Moderado
Aberraciones cromosómicas	DNA anormal	Subcelular	Media/tardía	Alto
Estabilidad lisosomas/ Necrosis/Genotoxicidad	Homeostasis mortalidad individual	Subcelular	Tardía	Alto
Inmunosupresión /Tumores	Homeostasis mortalidad Individual	Celular	Tardía	Alto
Inmunocompetencia	Fagocitosis	Celular	Media/tardía	Moderado
Transformación celular	Necrosis/neoplasia	Celular/tisular	Tardía	Alto
Fecundidad/Comportamiento	Cambios en la reproducción	Organismo	Tardía	Alto
Índices de condición	Variación en tasas de crecimiento	Organismo	Tardía	Alto
Mortalidad individuos	Cambios en la población	Población	Tardía	Alto
Diversidad	Disminución de la diversidad	Comunidad	Tardía	Alto

¹Temprana: de horas a días; media: de días a semanas; tardía: de semanas a meses/años.

Tabla 1. Ejemplo de biomarcadores, aparición en el tiempo y tipo de repuesta, nivel de organización biológica al que pertenecen y sus niveles de detección.

Por su significado podemos distinguir tres tipos de biomarcadores: de exposición, de efecto y de susceptibilidad [151]. Los de exposición, indican la presencia de contaminantes, metabolitos derivados de su biotransformación o productos de su reacción con biomoléculas [149, 151]. Los de efecto, indican el daño producido por la exposición o los cambios bioquímicos dentro de un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Estos últimos incluyen alteraciones bioquímicas, fisiológicas o de otro tipo dentro de los tejidos o fluidos corporales de un organismo. Finalmente, los de susceptibilidad o predicción de riesgos, predicen la posibilidad de una alteración grave a nivel de población, comunidad o ecosistema, se

INTRODUCCIÓN

refieren a las aptitudes inherentes o adquiridas específicamente por ciertos organismos a la exposición a xenobióticos [152-153]. Pueden además ser marcadores genéticos que incluyen alteraciones en la estructura cromosómica, tales como polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción o polimorfismos de actividades enzimáticas.

Un biomarcador debe ser específico para un compuesto o tipo de compuestos, detectable en pequeñas cantidades de muestras, medible por técnica barata, sencilla y reproducible, asociado a una exposición anterior, predictivo para un estado de alteración reversible [154]. La mayoría de los biomarcadores son inespecíficos, como las monooxigenasas que se inducen por muchos compuestos [155], aunque la δ -aminolevulinato deshidratasa se inhibe por Pb [23, 150] y algunas esterasas por OPs y CMs [156]. Los inconvenientes derivados de los falsos resultados positivos se evitan usando una batería de biomarcadores cuyos resultados se complementan para explicar una respuesta integrada a episodios de estrés ambiental [149].

Para conocer el estado de contaminación de un ecosistema que más se aproxime a la realidad conviene utilizar una batería de biomarcadores, organizados de formas jerárquicas y relacionadas funcionalmente entre ellos, cuyos resultados se complementen para dar una respuesta integrada a episodios de estrés ambiental [157].

Es conveniente que las medidas de los tres tipos de biomarcadores se lleven a cabo en los mismos individuos ya que, entre otras razones, facilita la demostración de relaciones causa/efecto y aumenta la capacidad de desarrollar modelos estadísticos que permitan predecir el grado de perturbación sufrido por el sistema. Además, la estacionalidad de los procesos fisiológicos (reproducción, desarrollo, etc.) y factores ambientales (nutrientes, temperatura, etc.) condiciona sus respuestas [158]. Para minimizarlo y facilitar la interpretación de los datos, los programas de biomonitorización deben realizarse en distintas épocas del año y/o usar organismos control o referencia en cada estación.

En conclusión, el análisis de biomarcadores de exposición y de efecto es un instrumento clave para detectar el impacto de la contaminación sobre la salud de los ecosistemas, normalmente en combinación con otras aproximaciones para la evaluación de la calidad del medio, como los análisis químicos convencionales, los bioensayos y los estudios ecológicos a largo plazo.

4.2. Enzimas de biotransformación como biomarcadores

Los organismos están continuamente expuestos a compuestos, naturales o sintéticos (xenobióticos), que pueden ser absorbidos del medio ambiente por inhalación, ingestión o

contacto dérmico. El metabolismo de los xenobióticos se produce en todos los órganos y tejidos, pero el hígado es el órgano detoxificador por excelencia.

Al conjunto de procesos enzimáticos a los que se ven sometidos los xenobióticos en el organismo, en general, a su neutralización y eliminación se les conoce como reacciones de biotransformación o de metabolización de xenobióticos. Las alteraciones en las actividades de enzimas de biotransformación suelen ser los biomarcadores más sensibles [159]. Tradicionalmente estos procesos se han agrupado en dos fases o etapas. En la fase 1 los xenobióticos son modificados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis y convertidos en productos más hidrosolubles gracias a la aparición de nuevos grupos funcionales de carácter polar (hidroxilo, amino, carboxilo). En la fase 2 los xenobióticos, o los metabolitos generados por las reacciones de la fase 1, se combinan con moléculas endógenas de carácter polar para formar productos de conjugación que son rápidamente excretados también (como glutatión, aminoácidos, ácido glucurónico, grupos sulfato, metilo o acetilo). En general, los enzimas de fase 1 son capaces de transformar múltiples sustratos y catalizar reacciones diferentes. Se trata de proteínas catalíticas de naturaleza muy diversa entre los que se incluyen enzimas con actividad monooxigenasa, como el citocromo P-450 o la flavin monooxigenasa, diversas oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, amino oxidasas, aromatasas), la epóxido hidrolasa o esterasas y amidasas hepáticas y plasmáticas (figura 13). El citocromo P-450 es sin duda el miembro más destacado de este grupo de enzimas y el que ha sido más ampliamente estudiado.

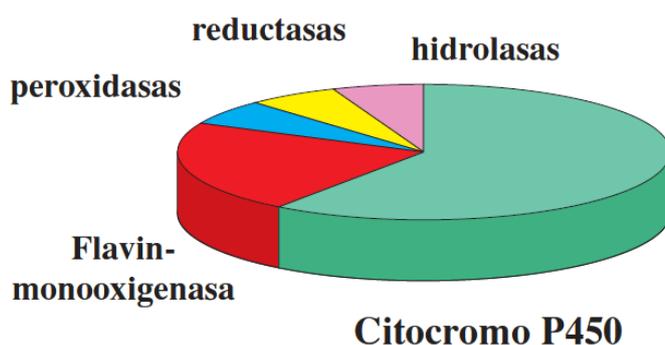


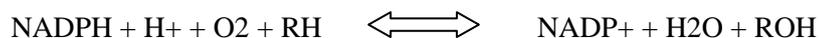
Figura 13. Participación relativa de diferentes enzimas de fase I en el metabolismo xenobióticos [160]

- Enzimas de fase I:

Muchas reacciones de fase I son de monooxigenación. En ellas, un átomo de oxígeno del O₂ es transferido al sustrato y el otro reducido a H₂O. Muchas monooxigenasas son sistemas acoplados de transporte de electrones con dos enzimas (citocromo y flavoproteína

INTRODUCCIÓN

oxidorreductasa) [155]. Los más abundantes y diversos dependen de citocromos P450, donde el poder reductor suele provenir del NADPH. La reacción es la siguiente:



Los citocromos P450 pertenecen a una superfamilia con multitud de isoenzimas [150]. Son hemoproteínas cuyo grupo prostético es una Fe-protoporfirina IX (hemo) y una cadena de entre 45 y 60 kDa [161]. El Fe se coordina a los 4 N del anillo tetrapirrólico de la porfirina, su quinto ligando es el S de una Cys, y el sustrato ocupa su sexta posición. Los electrones del NADPH son transferidos al citocromo P450 por una flavoproteína, NADPH-citP450 reductasa, cada una rodeada por 10 a 30 moléculas de P450 [155, 161].

Las distintas isoenzimas P450 actúan sobre muchos sustratos endógenos (esteroides, hormonas esteroideas, vitaminas liposolubles, prostaglandinas, ácidos grasos, etc.) y exógenos (3-metilcolantreno, fenobarbital, PAHs, PCBs) [150]. Catalizan las siguientes reacciones: N-oxidaciones, S- y P-oxidaciones, hidroxilaciones aromáticas, alifáticas y heterocíclicas, epoxidaciones, O-, N- y S-desalquilaciones, desulfuraciones, desaminaciones y deshalogenaciones oxidativas. Las tres principales familias que se inducen por xenobióticos son CYP1, CYP2 y CYP3 [155].

Las flavín monooxigenasas catalizan la oxidación de compuestos nitrogenados y sulfurados [150] por lo que son capaces de transformar algunos de los sustratos sobre los que actúan los citocromos P450 [162].

El sistema del citocromo b5 (citocromo b5 y NADH-cit b5 reductasa) y las epóxido hidrolasas activan las monooxigenasas del citocromo P450 y catalizan la conversión de epóxidos (productos de los P450) en dihidrodioles menos reactivos [150].

- Enzimas de fase II

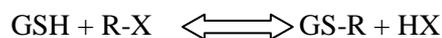
Los niveles de las enzimas de fase II también pueden afectarse por la exposición a contaminantes [163]. El mecanismo de inducción para la mayoría de enzimas de fase II es probablemente regulado por el receptor Ah. Bajo su control se encuentran un conjunto de genes que se conoce como batería génica Ah [164], entre los que se encuentran los genes de las enzimas UDP glucuroniltransferasa, NAD(P)H quinona reductasa y glutatión-S-transferasa [150].

Las UDP-glucuronosiltransferasas conjugan metabolitos hidroxilados en fase I, con ácido glucurónico en su forma activada (UDP-glucuronil), según la reacción:



Generalmente la conjugación disminuye la toxicidad de los xenobióticos, aunque en el caso del acetilaminofluoreno se ve incrementada [150].

Las glutatión-S-transferasas (GSTs) conjugan el glutatión (γ -Glu-Cys-Gly) reducido (GSH) con diferentes moléculas electrofílicas hidrofóbicas, según la reacción:

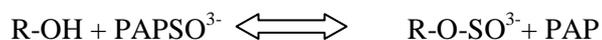


donde R es un radical alifático, aromático o heterocíclico, y X halógeno, sulfato, nitrito o epóxido.

Pueden distinguirse dos superfamilias con diferente estructura, actividad, distribución celular y actividad biológica: GST microsomales, unidas al retículo endoplásmico y GST citosólicas [165].

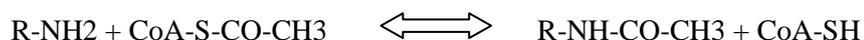
Las citosólicas son homo- o heterodiméricas de ~28 kDa cada subunidad [166]. Las cuales actúan sobre tóxicos derivados del daño oxidativo a lípidos y ácidos nucleicos, e intermediarios en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos [167-168]. Además, participan en la biotransformación de fármacos, carcinógenos y plaguicidas [169].

Las sulfottransferasas conjugan xenobióticos activados en la fase I con sulfato, en forma de 5'-fosfoadenosin-3'-fosfosulfato (PAPSO³⁻), según la siguiente reacción:



Ocasionalmente, esta conjugación aumenta la toxicidad de los sustratos [150].

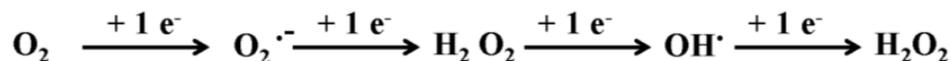
Las N-acetiltransferasas conjugan xenobióticos con grupos amino a grupos acetilos procedentes de la acetil-CoA [150], según la reacción:



4.3. Estrés oxidativo: Biomarcadores de daño oxidativo

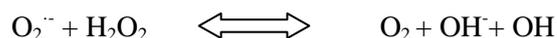
Los organismos aerobios usan O₂ como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria para obtener energía más eficientemente, y en la fagocitosis, pues a partir del O₂ se generan especies reactivas de oxígeno (EROs) que atacan a los agentes invasores. Sin embargo, también dañan ácidos nucleicos, proteínas, glúcidos y lípidos [170]. En ocasiones las defensas celulares frente a las EROs no son lo suficiente eficaces y se produce estrés oxidativo [171]. Las EROs se forman por reacciones endógenas o inducidas por bifenilos, aminas aromáticas y metales, durante la reducción unielectrónica del O₂ [10, 172]:

INTRODUCCIÓN

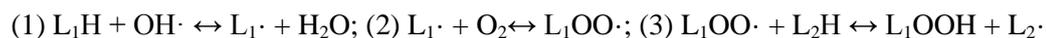


Muchas reacciones producen radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [170, 172-173]: 1) Oxidación de moléculas endógenas (semiquinonas, flavinas, tioles, catecolaminas) y metales. 2) Actividad de oxidasas y deshidrogenasas (NADPH-P450 reductasa, NADH oxidasa, xantina oxidasa) y cadenas de transporte electrónico. 3) Metabolismo de algunos xenobióticos, quinonas nitroaromáticas, bifenilos y metales de transición. 4) Ciclado redox.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se forma por dismutación espontánea o enzimática (superóxido dismutasa) del $\text{O}_2^{\cdot-}$, o por reducción dielectrónica directa del O_2 , catalizada por la ácido graso oxidasa, aminoácido oxidasas, etc [170]. La especie más reactiva es el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), formado a partir de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en la reacción de Fenton [170] catalizada por iones metálicos:



Las EROs no causan daño oxidativo en condiciones normales, es decir, cuando existe un equilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes. Sin embargo, cuando tal equilibrio se rompe a favor de las sustancias prooxidantes se produce el estrés oxidativo [172, 173]. Al ser sustancias muy tóxicas las EROs causan daños oxidativos en las biomoléculas: ácidos nucleicos, proteínas, glúcidos y lípidos [170]. Las proteínas sufren roturas de los anillos en los residuos de His y Trp, o del enlace peptídico a nivel de las Pro, formación de puentes disulfuro o disulfuros mixtos en los residuos de Cys que puede conducir a la inactivación temporal de enzimas [174]. La formación de disulfuros mixtos entre proteínas y GSH altera el estado redox intracelular entre las formas reducidas y oxidadas del glutatión. Las EROs provocan numerosos daños en el ADN, rotura de cadenas, alteración de bases, aberraciones cromosómicas e intercambios entre cromátidas hermanas, que pueden provocar mutaciones [172, 10]. El radical hidroxilo (OH^{\cdot}) ataca los ácidos grasos poliinsaturados, integrantes de los fosfolípidos de las membranas, en una reacción de peroxidación lipídica [171, 175]:



Si los lipohidroperóxidos formados (LOOH) no se eliminan, generan (en reacciones catalizadas por metales) otros radicales (LO^{\cdot}), que pueden atacar otras biomoléculas, como ácidos nucleicos y proteínas [171]. Los niveles de peroxidación lipídica pueden medirse directamente, siguiendo el contenido de lipohidroperóxidos, o indirectamente, por los niveles de malondialdehído. Este compuesto es un producto de la descomposición de los

lipohidroperóxidos, que forma un complejo coloreado y fluorescente con el ácido tiobarbitúrico [175-176].

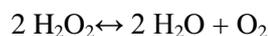
Los sistemas antioxidativos eliminan EROs para evitar daños en los organismos [170-172]. Puesto que muchos contaminantes ambientales incrementan la producción de EROs, estos sistemas tienen gran importancia en la defensa de los organismos contra la contaminación ambiental.

El sistema de defensa antioxidativo incluye: 1) enzimas (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) que detoxifican directamente las EROs; 2) defensas no enzimáticas (vitaminas C y E) capaces de detoxificar EROs interrumpiendo la cadena de reacciones que las generan; y 3) sistemas auxiliares (glucosa-6-P deshidrogenasa, glutatión reductasa) que regeneran poder reductor, NADPH y GSH, que se consume durante detoxificación de las EROs [170].

1) Enzimas oxidativas que detoxifican directamente las EROs.

Las **superóxido dismutasas (SOD)** son metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical anión superóxido, en la reacción: $2 O_2^- + 2 H^+ \leftrightarrow H_2O_2 + O_2$. En eucariotas, se distinguen las isoenzimas que poseen Cu y Zn (Cu/Zn-SOD), de localización citosólicas, que se inhiben por la acción del cianuro, y la Mn-SOD, de la matriz mitocondrial, que no se inhibe por el cianuro [177]. La SOD es inducible por contaminantes y alto nivel de O_2 [23] y representa la principal defensa contra el estrés oxidativo en los organismos, por eso se ha usado en numerosos estudios como biomarcador de contaminación por metales pesados y estrés oxidativo [57, 178-180].

La **catalasa (CAT)** posee un grupo hemo en su sitio activo, y está presente en todos los organismos aerobios estudiados, eucariotas y procariotas [170]. En eucariotas, se localiza principalmente en los peroxisomas. Cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno:

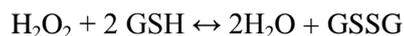


La catalasa es más efectiva en niveles de alto estrés oxidativo, mientras que a niveles bajos de estrés actúa mejor el sistema glutatión peroxidasa [181].

La **glutatión peroxidasa (GSHPx)** es una enzima citosólica dependiente de Se que cataliza la reducción de peróxidos orgánicos y peróxido de hidrógeno, usando GSH como donador de electrones:



INTRODUCCIÓN



Esta enzima juega un papel importante en la protección de la célula frente al daño oxidativo evitando la peroxidación lipídica [182].

2) Defensas no enzimáticas capaces de detoxificar EROs interrumpiendo la cadena de reacciones que las generan:

La **vitamina E** (α -tocoferol), presente en las membranas celulares combate la peroxidación lipídica en estas al reaccionar con los radicales lipídicos y romper la cadena de peroxidación lipídica.

La **vitamina C** (ascorbato) es un antioxidante que reduce la semiquinona del α -tocoferol [170]. Sólo se usa como biomarcador en plantas y animales que lo pueden sintetizar [159].

3) Sistemas auxiliares (glucosa-6-Pdeshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, glutatión reductasa) que regeneran poder reductor, NADPH y GSH, que se consume durante la detoxificación de las EROs [170].

La glutatión sintetasa y glutatión reductasa son responsables de la síntesis y reducción del glutatión [23]. La glucosa-6-P deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, forman parte de la ruta de las pentosas fosfato y producen NADPH [172]. La NADPH-quinona oxidoreductasa cataliza la reducción divalente de quinonas a hidroquinonas, evitando así la producción masiva de anión superóxido y el consumo excesivo de NADPH [183].

4.4. Metales más relevantes en metaloproteínas de interés ambiental

El término metaloproteína es un término genérico que se refiere a una proteína que contiene un ión metálico como cofactor (figura 14). Las funciones de las metaloproteínas son muy variadas en las células, actuando como enzimas, proteínas de transporte y almacenamiento, y en la transducción de señales. Aproximadamente de un cuarto a un tercio de todas las proteínas requieren metales para llevar a cabo sus funciones. La presencia de los iones metálicos en las metaloenzimas les permite llevar a cabo reacciones redox que no pueden ser fácilmente realizadas por el conjunto limitado de grupos funcionales que se encuentran en los aminoácidos [184].

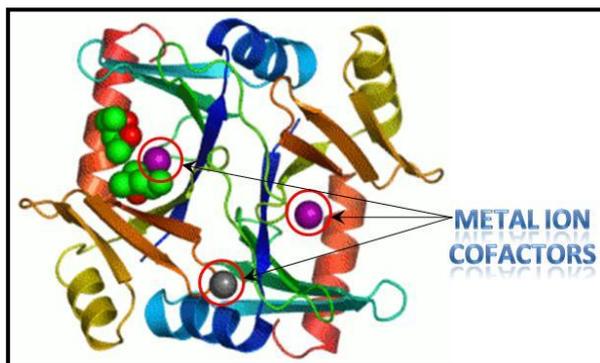


Figura 14. Estructura de las metaloproteínas

Las funciones de las metaloproteínas son muy variadas en las células: Estructural (el ión metálico es necesario para la correcta conformación de una región proteica y tiene una función reguladora), transporte y almacenaje, transferencia de electrones (el ión metálico sirve como centro redox para transferir, almacenar o aportar electrones. Además, el potencial redox del ión metálico viene definido por la proteína), enlace con el O_2 y catalítica (interviniendo en el desarrollo de estados de transición, de activación de sustratos entre otros).

El metal suele estar coordinado por átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre pertenecientes a los aminoácidos de la cadena polipeptídica y/o ligando macrocíclico incorporado en la proteína. De esta forma, la presencia del metal o metaloide es fundamental en la biomolécula y por ello, a continuación hacemos una revisión de los metales o metaloides más importantes y su relación con las funciones de determinadas biomoléculas.

Los principales iones metálicos presentes en las metaloproteínas son el Fe (citocromos, transporte de oxígeno, enzimas), Zn (insulina, anhidrasa carbónica), Cu (oxidoreductasas) y Mn (enzimas glicolíticas y proteasas). Dentro de las metaloproteínas cabe destacar las metalotioneínas. Este tipo de proteínas destaca por su alto contenido en grupos sulfhidrilos y son metaloproteínas de tipo citoplasmático que se encuentran en todos los vertebrados, invertebrados (llamándose en este caso proteínas similares a las metaloproteínas, MLP, metallothionein like proteins) y en hongos. Se considerará en el siguiente apartado.

El **hierro** es un elemento reconocido por la OMS en 1973 como esencial, aunque su situación dentro de los elementos traza es discutible debido a la gran cantidad del mismo que presenta la hemoglobina. El hierro es un elemento necesario para la vida, y su deficiencia es la carencia de micronutrientes más frecuente en el mundo. Este elemento de transición juega un papel crucial en el interior de la célula, como catalizador en procesos de transporte electrónico y como transportador de oxígeno. Las proteínas de las que forma parte el hierro se pueden agrupar en proteínas hemo, proteínas ferroflavínicas y otras proteínas que contienen hierro con una gran variedad de configuraciones moleculares, como la transferrina, la lactoferrina, la ferritina y la hemosiderina.

INTRODUCCIÓN

La hemoglobina y la mioglobina son proteínas con grupo hemo. La hemoglobina es una proteína de color rojo, con una masa molecular de 68 kDa, que une el oxígeno con alta afinidad, transportándolo a los hematíes y liberándolo en los tejidos. La mioglobina tiene una masa molecular de 17 kDa y se encuentra en las células musculares, donde les sirve de almacén de oxígeno para proteger contra la lesión celular durante los períodos de falta de oxígeno. También son hemoproteínas los citocromos, citocromo oxidasa, ferropoteínas detoxificadoras catalasas, peroxidases y superóxido dismutasas, que participan en la reducción de peróxidos y limitan la acción de los radicales libres; y las oxigenasas.

Las proteínas ferroflavínicas incluyen la citocromo *c* reductasa, succinico deshidrogenasa, NADH deshidrogenasa y xantina oxidasa. Estas proteínas con funciones biológicas importantes no actúan o no llegan a formarse sin la participación del hierro. Para abundar en la importancia del hierro indicaremos que casi la mitad de las enzimas del ciclo de Krebs contienen hierro o necesitan su presencia.

En el tercer grupo se encuentran la transferrina, la lactoferrina, la ferritina y la hemosiderina, fundamentalmente. Siendo la transferrina el transportador fundamental del hierro. Ésta proteína se sintetiza en el hígado y en los linfocitos T colaboradores, cuya síntesis está regulada por la cantidad de hierro intracelular, de forma que una disminución de éste produce un aumento de la transferrina.

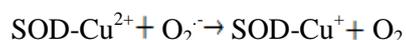
El **manganeso** forma parte de unas pocas enzimas, como la arginasa, implicada en la formación de la urea, la piruvato carboxilasa, que participa en la gluconeogénesis y la superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial, que interviene en los mecanismos de protección contra los radicales libres oxigenados. En general, en las situaciones que favorecen el estrés oxidativo se observa un aumento de la actividad de la SOD. Sin embargo, activa muchas otras enzimas como hidrolasas, quinasas, descarboxilasas y transferasas.

El **cobre** forma parte del grupo de los elementos traza esenciales, en el que su esencialidad, se debe a sus características físico-químicas que le confieren ~~de~~ unas propiedades mediante las cuales participa en una gran diversidad de procesos bioquímicos inherentes de la materia viva. En el plasma, la mayor parte del cobre se encuentra unido a la ceruloplasmina, mientras que el 10% se distribuye entre la albúmina, los aminoácidos como la histidina, la treonina y la glutamina y pequeños péptidos con los que forma complejos binarios y es transportado hacia el hígado, siendo el principal órgano que recibe el cobre absorbido y el lugar principal de excreción, ya que se elimina por la bilis.

La estructura de la SOD se compone de cuatro subunidades de peso molecular 86.000 Da con dos átomos de manganeso por molécula, son metaloenzimas que contienen un ión

metálico de transición (cobre, hierro o manganeso) en su sitio activo, nos centraremos en la SOD de Cu y Zn, la cual se encuentra ampliamente distribuida en el citosol y en el núcleo de las células eucariotas y algunas procariotas. La SOD Cu/Zn es una proteína con dos dímeros idénticos, cada uno con un cobre y un zinc, fuertemente unidos a la cadena polipeptídica. Las dos subunidades están unidas por interacciones no covalentes, predominantemente hidrófobas, entre los cilindros con estructura β , encontrándose los centros activos en los puntos opuestos de la molécula. El cobre se encuentra relativamente expuesto al medio, mientras que el zinc está más enterrado en la estructura proteica.

La principal función de la SOD consiste en eliminar al radical superóxido mediante reacciones de oxidación-reducción cíclica de un cofactor metálico como se describe en las siguientes reacciones:



Este equilibrio entre el radical superóxido y la SOD, es un equilibrio muy sensible y delicado, que puede alterarse seriamente por la producción en exceso de radical superóxido, el cual suele generarse por mecanismos patológicos o genéticos, además de factores exógenos. Tanto el radical superóxido como los productos que derivan de él, como son el radical hidroxilo, el oxígeno singlete excitado, los peróxidos, etc, más tóxicos que el radical superóxido, pueden iniciar una cadena de reacciones que conduzca a daños celulares tan importantes como hidroxilar las bases púricas y pirimidínicas del ADN, originándose mutaciones, peroxidación de lípidos, que origina pérdidas en la integridad de las membranas lipídicas y otros componentes celulares esenciales.

El **zinc**, al igual que el cobre, es un elemento químico esencial para los seres humanos y ciertos animales. El zinc puede ser esencial para la estructura, regulación y/o la acción catalítica de una enzima. Influye en la actividad de unas 300 enzimas distribuidas en seis clases: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Se halla en enzimas que intervienen en el metabolismo del ADN, influye poderosamente en la síntesis de proteínas a nivel de la traducción; participa en la glicolisis y neoglucogénesis, en la síntesis de prostaglandinas y en el metabolismo del colesterol; previene la peroxidación lipídica y mantiene las estructuras de membrana.

El **arsénico** es tóxico para la mayoría de formas de vida. El arsénico inorgánico y sus compuestos, al entrar en la cadena alimentaria, son progresivamente metabolizados a una forma menos tóxica de arsénico a través de un proceso de metilación. Los

INTRODUCCIÓN

compuestosórgano-arsénicos surgen a través de "biometilación" de compuestos de arsénico inorgánico, a través de procesos mediados por enzimas relacionadas con la vitamina b12. El arsénico unido a carbohidratos da lugar a los compuestos conocidos como "arsenoazúcares". Muchas especies marinas contienen compuestos liposolubles de arsénico como arsenobetaina y arsenocolina y en algas abundan los arsenoazúcares. Además, el arsénico induce la producción de metalotioneína, una proteína rica en grupos SH y podría actuar como activador de la ornitina decarboxilasa, la S-adenosil-metionina decarboxilasa y la aminopropiltransferasa, que participan en el control del crecimiento y la proliferación celular.

4.5. Biomarcadores convencionales: La metalotioneína y la peroxidación lipídica

El estudio de los metales y metaloides en el sistema bioquímico que involucra células muy complejas y tejidos requiere la integración de enfoques experimentales para resumir las múltiples variables que intervienen en los ecosistemas de trabajo. Muchos de los métodos utilizados para evaluar la respuesta es el uso de biomarcadores bien establecidos para vigilar las áreas críticas, como la metalotioneína y la peroxidación lipídica.

Como se ha comentado en apartados anteriores, mediante el uso de organismos bioindicadores, una variedad de parámetros moleculares (o *biomarcadores*) que responden al estrés ambiental se utilizan como señales de alerta temprana que alerta ante la aparición de daños irreversibles al ecosistema [185], generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen efectos deletéreos en los organismos acuáticos, tales como estrés oxidativo, ya que refuerza la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [12, 171]. Esto se traduce en daños oxidativos a varias biomoléculas, tales como lípidos y un contenido alterado y el estado redox del glutatión; además de un aumento en las actividades de varias enzimas antioxidantes, tales como metalotioneínas (MTs), que son inducidos por metales tóxicos.

Estos efectos suelen ser evaluados mediante el análisis de ciertos mecanismos de desintoxicación de metales donde las MTs asumen un papel importante debido a que muestran la capacidad de unirse o formar un complejo inactivo con ciertos metales por quelación a través de residuos de cisteína, favoreciendo su almacenamiento o excreción, así como propiedades reconocidas secuestrando oxiradicales [186-187]; lo que permite que se utilice como biomarcador de exposición a metales.

Las MTs son una familia de proteínas ricas en cisteína, de bajo peso molecular (MW que van desde 500 hasta 14000 Da). Las MTs tienen la capacidad de unirse a metales tales como el zinc, cobre, selenio, cadmio, mercurio, plata y arsénico, a través del grupo tiol de sus residuos de cisteína, lo que representa casi el 30% de sus residuos de aminoácidos [188]. Las células de los mamíferos sintetizan dos isoformas MT-I y MT-II. Cada metalotioneína está formada por 61

aminoácidos de los cuales 20 son de tipo cisteína, destacando la ausencia de puentes disulfuro. Se han llegado a elucidar dos isoformas más la MT-III y la MT-IV [189-190] presentes en la lengua y en el cerebro de mamíferos. Las diferentes isoformas se diferencian por el punto isoeléctrico y la hidrofobidad que presentan, ya que se distinguen por poseer algún aminoácido extra que puede variar en número de 1 a 15. Por ello, este tipo de proteínas se puede separar mediante cromatografía de intercambio iónico [191-192].

Como ya se ha comentado, existen dos isoformas, la MT-I y la MT-II. Constituyen el mayor almacén de elementos esenciales como cobre y zinc. Si el nivel de estos elementos es alto en el organismo, se produce la transcripción de los genes de las MTs y se sintetizan muchas de ellas para unirse a estos metales. La acumulación de metalotioneína está inducida por la presencia de Zn, Cu, Hg y Cd, principalmente [193]. Por ello son detoxificantes de metales. Cuando la concentración de metales es baja, las MTs son rápidamente degradadas. Otras propiedades intrínsecas de las MTs son la resistencia a la termocoagulación y a la precipitación ácida. Se pueden purificar mediante cromatografía de exclusión de tamaño y por intercambio iónico. El contenido de metal varía con la especie y el órgano origen de la proteína. Así, en general las metalotioneínas en el hígado tienden a contener solo zinc, mientras que las del riñón contienen Cd y Zn.

Las medidas del contenido intracelular de metal unido a metalotioneína sirven para hacer una estimación indirecta de la contaminación. Como ya se ha comentado, el metal absorbido por el organismo se une a la metalotioneína. Esta unión provoca la transcripción del ácido ribonucleico mensajero, o sea, se induce la síntesis de más metalotioneína unida a metal. La inducción de metalotioneínas es, por tanto, una respuesta protectora para reducir la concentración de contaminantes libres presentes en las células, ya que presentan la capacidad de unirse a los iones metálicos eliminándolos del medio cuando la presencia de estos es elevada.

La peroxidación lipídica (lipid peroxidation: LPO) se asocia con una presencia de más de ROS debido a fallo del sistema de defensas antioxidantes. La formación de peróxidos lipídicos se caracteriza por la presencia de un subproducto: malondialdehído (MDA) y hidroxialquenos que se considera un biomarcador útil para evaluar daños [12, 171]. LPO conduce a una pérdida de la integridad y función de la membrana y, como resultado, a un daño estructural y funcional de las células, tejidos y órganos enteros [171].

El estrés ambiental inducido en el cangrejo *Procambarus clarkii* se ha evaluado en estudios previos por el uso de varios biomarcadores moleculares que refleja los efectos de los contaminantes sobre el metabolismo celular [144, 194]. En el capítulo 3 del presente trabajo se muestran resultados de biomarcadores convencionales medidos en *P. Clarkii*, tales como metalotioneína y la peroxidación lipídica para evaluar la respuesta al estrés ambiental por

INTRODUCCIÓN

metales, lo que nos aporta información complementaria al capítulo 4, en el que se ha desarrollado un análisis metabolómico para investigar las relaciones entre los niveles de metal y la respuesta metabólica del organismo [69].

5. ÁREAS DE INTERÉS AMBIENTAL DEL SUROESTE DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

El muestreo de organismos se ha repartido en dos zonas de estudio para los diferentes bioindicadores, situadas en el suroeste de la península ibérica, como se muestra en la figura 15.

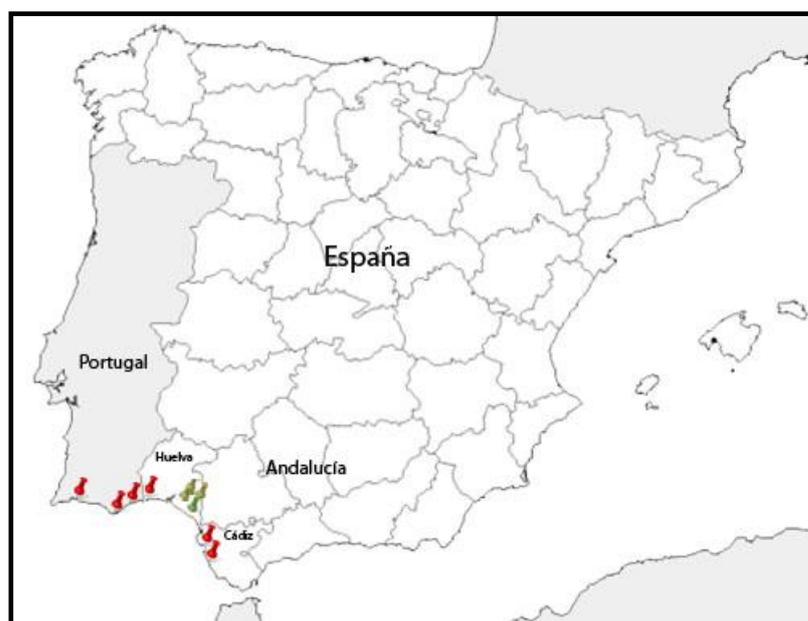


Figura 15. Muestreo de bioindicadores. Puntos rojos: muestreo de *Scrobicularia plana*. Puntos verde y amarillos: muestreo de *Procambarus clarkii*. El punto verde está localizado en el Parque Nacional de Doñana

5.1. Marismas y ecosistemas acuáticos de la región transfronteriza de España y Portugal

Los niveles de contaminación de metales pesados son generalmente más altos en los estuarios que en el mar abierto. Algunos estuarios como el estuario del Río Arade, de Ría Formosa y del Guadiana en Portugal o del Caño de Sancti-Petri y el Río Guadalquivir en la provincia de Cádiz (España), por ejemplo, tienen niveles particularmente altos de contaminación de metales, aunque mantienen una biomasa bentónica muy alta y permanecen bastante productivos. Las mediciones de contaminación de los sedimentos son muy variables debido a los diversos métodos de análisis químico, el origen de los sedimentos y la diversidad de las fuentes de contaminación a las que se encuentran sometidos los estuarios. Por supuesto, la

respuesta a los contaminantes varía mucho entre especies y conjuntos. Los metales traza explican sólo una pequeña parte de la variación en la estructura de la comunidad bentónica. Algunas especies, como el camarón *Crangon crangon*, parece vulnerable a la contaminación por metales [195], mientras que otras especies, como *Scrobicularia plana*, son capaces de tolerar niveles bastante altos de cadmio en sus tejidos [196].

5.1.1 Situación medioambiental del área de estudio

La costa sur de Portugal tiene unos 150 km desde su margen occidental en el Océano Atlántico hasta la frontera oriental con España, separados por el río Guadiana. Esta zona costera tiene tres principales sistemas acuáticos, el río Arade y el estuario del Guadiana y la laguna de Ria Formosa. Existen varios focos de contaminación que ya se han identificado a lo largo de esta costa siendo los principales contaminantes orgánicos presentes metales, PAHs, PCBs y compuestos orgánicos de estaño (TBT), principalmente.

Para la descripción de la situación medioambiental del área de muestreo, vamos a comenzar en la zona más occidental de la Península Ibérica, en Portugal hasta la zona más oriental en Cádiz (España). Por lo que comenzamos por el estuario del Río Arade, un sistema de gran importancia ecológica y económica que se encuentra bajo una creciente presión antropogénica debido a la existencia de un gran puerto pesquero y un puerto deportivo. El estuario recibe las aguas residuales tratadas de la ciudad adyacente de Portimao (45.500 habitantes), y en los últimos años, ha habido un aumento en las prácticas en piscifactorías que liberan nutrientes y compuestos químicos en la zona.

La Ría Formosa es una gran laguna de marea que se extiende unos 55 km a lo largo de la costa sur de Portugal y tiene una anchura máxima de 6 km, tiene también la categoría de parque natural de más de 170 km² y un lugar de parada para cientos de aves diferentes durante la primavera y los períodos migratorios de otoño. La parte occidental de la laguna está delimitada por una zona densamente urbanizada rodeada de tierras agrícolas [197].

Dentro de la laguna se desarrollan actividades importantes para la economía como el marisqueo y la acuicultura. Sin embargo, en los últimos 10 años, la producción disminuyó como consecuencia del deterioro de la calidad del agua de la laguna. La liberación de metales en la laguna a través de aguas residuales no tratadas, efluentes industriales y la escorrentía agrícola contribuyó a la disminución de la población de almejas y se convirtieron en una importante amenaza ambiental [129, 198].

Por otro lado, el río Guadiana, es el cuarto río más largo de la Península Ibérica, con una longitud total de 810 kilómetros. El último tramo de 200 kilómetros forma una frontera

INTRODUCCIÓN

natural entre Portugal y España. En términos geológicos, el estuario se encuentra casi en su totalidad en el dominio central (Faja Pirítica Ibérica) de la zona sur portuguesa. En un sentido físico, el estuario del Guadiana cubre la zona de influencia de las mareas que se extiende 50 kilómetros aguas arriba del punto donde el río desemboca en el océano Atlántico. La Faja Pirítica Ibérica, a través de la cual fluye el río Guadiana, es una de las provincias metalogénicas más importantes del mundo, con las reservas originales de cerca de 1700 millones de toneladas de sulfuros [199]. Este estuario se ve afectado por el drenaje ácido de minas, y por los procesos de coagulación/precipitación inducidos por sales naturales, a través de los cuales los elementos suspendidos en partículas se incorporan en los sedimentos [200], y son alterados. Estos ambientes se caracterizan por poseer altas concentraciones de sulfato, de metal y metaloides, el comportamiento de éstos es controlado por los cambios en el pH y la salinidad. Como resultado, todas estas modificaciones conductuales pueden reflejarse en las características geoquímicas de los sedimentos [201].

En la zona de Cádiz, los ecosistemas litorales están constantemente amenazados por la contaminación debido a su proximidad a los asentamientos humanos y a la alta actividad económica e industrial, que se ha diversificado por la incorporación de otras industrias que utilizan metales, tales como la fabricación de componentes de vehículos y aeronaves.

El estuario del río Guadalquivir, nace en la Cañada de las Fuentes (Sierra de Cazorla), en el término municipal de Quesada (Jaén). Su cuenca hidrográfica abarca territorios de Jaén, Córdoba, Almería, Granada, Málaga, Sevilla, Huelva y Cádiz, así como de Murcia, Albacete, Ciudad Real y Badajoz. Desemboca en el Océano Atlántico por Sanlúcar de Barrameda, en un amplio estuario entre la provincia de Cádiz y la de Huelva. Entre Sevilla y el estuario, se sitúa una amplia zona húmeda: las Marismas del Guadalquivir. Es el quinto río por longitud de la península ibérica. En su recorrido por Andalucía de este a oeste, atraviesa ciudades como Andújar, Córdoba o Sevilla. La principal característica de los afluentes del Guadalquivir es la gran diferencia entre los de ambos márgenes, que son expresión de las considerables diferencias geográficas que existen entre Sierra Morena y las Cordilleras Béticas.

El Río Guadiamar es el último afluente del Río Guadalquivir, el Río Guadalquivir fue influenciado previamente por un derrame de minería a gran escala en abril de 1998, provocada por la rotura de una balsa de residuos en una mina de pirita se encuentra en 'Aznalcóllar' (figura 18) [202]



Figura 16. Rotura del muro de contención de la balsa minera de Aznalcóllar.

Por último, el Caño de Sancti-Petri (Puente Zuazo), es una zona de marisma inundada regularmente y lavado por el mar debido a las mareas. Su corriente de agua de mar, que fluye entre las localidades gaditanas de San Fernando (situada en una isla), Chiclana de la Frontera y Puerto Real (en la Península), separando a Chiclana y a Puerto Real del tómbolo arenoso donde se asientan Cádiz y San Fernando. Sobre él pasa el Puente Zuazo, símbolo de San Fernando y que une a la ciudad con el resto de la provincia. Es una zona altamente productiva, donde las actividades de acuicultura y pesca se han celebrado tradicionalmente. También es importante desde el punto de vista ecológico, que justificó su calificación como Parque Natural en 1996 [157, 203].

5.2. Parque Nacional de Doñana y su entorno

La reserva natural de Doñana está situada en la margen derecha del río Guadalquivir a su paso por el sur de las provincias de Huelva y Sevilla, se caracteriza por presentar un mosaico de ecosistemas que albergan una biodiversidad única en Europa (figura 17).

Es un territorio conformado por más de 100.000 ha de espacio protegido. Dentro de este conjunto territorial el Parque Nacional, declarado en 1969, ocupa una extensión de 54.252 ha. En 1989, se crea el Parque Natural, estrechamente unido al Parque Nacional, con el comparte ecosistemas, y que cubre una extensa región natural de gran valor ecológico de más de 50.000 ha. Además, también hay más de 20.000 ha con Zona de Protección del Parque Nacional de Doñana. El Parque Nacional de Doñana es uno de los humedales más emblemáticos de Europa, integrado por el Gobierno Español en el Convenio de Ramsar para la protección de los humedales. La UNESCO le otorgó el título de Reserva de la Biosfera y está reconocido como Patrimonio de la Humanidad. En el Parque viven especies únicas y en serio peligro de extinción, como el águila imperial ibérica o el lince, además de presentar una variada avifauna y un extraordinario conjunto de valores naturales. Destaca sobre todo la marisma, de extraordinaria importancia como lugar de paso y cría para miles de aves europeas y africanas (figura 19).



Figura 17.Lince ibérico y marisma en Doñana

Doñana supone la confluencia de un conjunto de ecosistemas (playa, dunas, cotos, marisma y otros componentes naturales) que dotan a este Parque de una personalidad única. La flora del Parque es muy diversa (más de 900 especies de plantas vasculares y helechos) debido a los diferentes ecosistemas presentes, tanto acuáticos como terrestres. Cada ecosistema posee una fauna propia y diferenciada. Aquí encontramos 20 especies de peces de agua dulce, 11 de anfibios, 21 de reptiles, 37 de mamíferos no marinos y 360 aves, de las que 127 se reproducen habitualmente en el Parque.

5.2.1. Situación medioambiental de Doñana y su entorno

Doñana se sitúa sobre el acuífero Almonte-Marisma que va del río Tinto al Guadalquivir y ocupa una superficie 2500 km² en las provincias de Huelva y Sevilla. El drenaje natural del acuífero se produce a través del río Guadamar, del arroyo de La Rocina, del Océano y de las propias marismas. Sobre el acuífero también se asienta una población de 185.000 habitantes distribuidos en 22 núcleos urbanos. Debido al desarrollo humano, Doñana se ve amenazada por las actividades urbanas, agropecuarias, industriales y mineras que suponen un riesgo medioambiental [204].

Las aguas residuales de la mayoría de los municipios se han venido vertiendo sindepurar sobre el acuífero aunque ya se han construido varias estaciones depuradoras de aguas residuales. Los efluentes urbanos afectan al río Guadamar y al arroyo del Partido. Las prácticas agropecuarias son un motor importante en la economía de la zona. Existen un gran número de cabezas de ganado y hectáreas de regadío que probablemente sean las causantes de la elevada cantidad de compuestos nitrogenados que aparecen en las aguas subterráneas. Las actividades agrícolas afectan Doñana de tres formas: la extracción de agua subterránea para regadíos como el cultivo de fresas, el uso de agua superficial para arrozales, y la contaminación por fertilizantes y plaguicidas. En aguas intersticiales del Partido se han encontrado valores altos de

nutrientes (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{3-}) y así como metales (Al y Cr), en niveles que pueden deberse a la aplicación de fertilizantes [205].

En el sector industrial destacan las numerosas almazaras, industrias de procesado de uva y vegetales, también existen industrias cárnicas y lácteas, cuyos vertidos afectan al Partido y al curso bajo del Guadiamar.

Al norte de Doñana, se explotaban desde 1979 las minas de piritas de Aznalcóllar, como se comentó en el apartado anterior, cuyos subproductos se almacenaban en una balsa de estériles, que tras las lluvias intensas, liberaba metales muy móviles al río Guadiamar arrastrándolos aguas abajo. En 1998 tuvo lugar la rotura del muro (figura 16) de contención de la balsa de residuos mineros de dicha mina, a través del río Agrio los lodos alcanzaron el cauce del río Guadiamar, por lo que se llevó a cabo la construcción de varios muros que eliminó los aportes de éste a Doñana.

Este accidente supuso la liberación de residuos mineros fluidificados y la incorporación de aproximadamente 2 Hm^3 de lodos tóxicos y 4 Hm^3 de aguas ácidas al cauce del río Guadiamar [206-207]. La composición química del lodo vertido a la cuenca fue la siguiente: Hierro (34-37%), Azufre (35-40%), Zinc (0,8%), Plomo (0,8%), Arsénico (0,5%), Cobre (0,2%), Antimonio (0,05%), Cobalto (0,006%), Talio (0,005%), Bismuto (0,005%), Cadmio (0,003%), Plata (0,003%), Mercurio (0,002%) y Selenio (0,001%), mientras que las aguas ácidas contenían fundamentalmente piritas, FeS_2 , Pb, Au, Zn, Cu y As [207].

El vertido afectó alrededor de 67 Km de cauce lineal y 500 m de anchura media en ambos márgenes, desde la mina hasta el lugar conocido como Entremuros, en el límite del Parque Nacional de Doñana. La superficie contaminada fue de 4.286 ha pertenecientes a terrenos de nueve municipios de la provincia de Sevilla [208].

En un primer momento se retiraron 37 toneladas de peces muertos, 40 toneladas de anfibios, 20 de aves y 8 de mamíferos [208]. Obviamente, tanto la flora como la fauna fue completamente arrasada debido, por un lado, a la elevada contaminación química del agua, ya mencionada, a los que había que añadir valores de oxígeno disuelto mayores a 1 g/l y de $\text{pH} \approx 3$, y por otro a la acción mecánica de la riada [207].

Las labores de extracción de lodo del canal principal y de la cuenca de inundación afectaron también a las características geomorfológicas, hidrológicas y geoquímicas del sistema fluvial [209-212]. De este modo, la fauna y flora colonizadora del río se encontró con un hábitat profundamente alterado y una elevada carga contaminante residual.

INTRODUCCIÓN

Con el fin de controlar y remediar la contaminación generada por el vertido minero, la Consejería de Medio Ambiente puso en marcha un plan de acción denominado “La Estrategia del Corredor Verde del Guadiamar” en el que, entre otros objetivos, se pretendía estudiar la fauna acuática del río Guadiamar por ser una de las más afectadas por el accidente [208].

Por tanto, el área de Doñana es un espacio complejo, donde coexisten algunos de los más preciados valores medioambientales con el desarrollo económico y social de las poblaciones circundantes. En un estudio para la valoración medioambiental de los efectos de los Planes de Desarrollo Regional de la Unión Europea en el Parque Nacional de Doñana, la mayoría de los impactos fueron positivos aunque, un 32,2 % fueron negativos [214].

El seguimiento de las alteraciones que se puedan producir en los delicados ecosistemas de Doñana por las distintas actividades antropogénicas, es algo esencial para el desarrollo sostenible de la zona.

Otra fuente potencial de contaminación se sitúa a 45 Km al noroeste del Parque, a orillas del ríos Odiel y Tinto y son los Polos Industriales de Huelva que cuentan, entre otras, con numerosas industrias de transformación minera, un complejo petroquímico y una central térmica, cuyos contaminantes pueden alcanzar Doñana por las corrientes marinas o transportados por vía eólica.

6. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA A LA CONTAMINACIÓN

6.1. Metalómica

Los procedimientos metalómicos requieren metodologías analíticas multidimensionales, que integren al menos tres componentes o unidades instrumentales, como se resume en la figura 18 [215-216]:

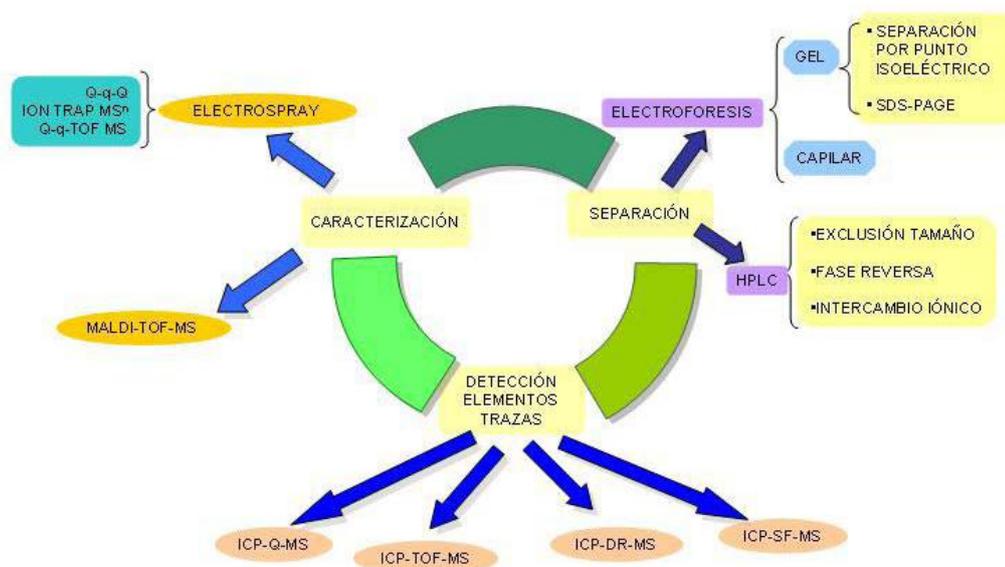


Figura 18. Metodologías analíticas utilizadas en metalómica [215]

Entre estos componentes se encuentran:

Una unidad de separación, cromatografía electrocinética capilar (CEC), electroforesis capilar (CE), que contribuye al aislamiento de la matriz para su introducción progresivamente en el tiempo en el sistema de detección, componente de selectividad. Alternativamente, la muestra se puede introducir mediante ablación láser de tejidos biológicos o de los spots obtenidos mediante electroforesis en gel (GE). Asimismo, se pueden utilizar diferentes mecanismos de separación cromatográfica a escala preparativa, capilar o nanocromatografía, y habitualmente se utilizan dos o más sistemas cromatográficos ortogonales (complementarios) combinados, como exclusión de tamaño (SEC) [178], fase reversa (RP) [217], cromatografía de intercambio iónico (IEC), de interacción hidrofílica (HILIC) [218] y de afinidad.

Una unidad de detección elemental que utiliza un detector de gran sensibilidad, generalmente ICP-MS, para la cuantificación de los elementos, componente de sensibilidad. En este sentido, se han utilizado diferentes analizadores de masas como el cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF), sector magnético (SF) o multicolector (MC).

Un detector específico para moléculas, generalmente basado en el empleo de espectrómetros de masas en tándem, para la caracterización de biomoléculas, componente estructural. El uso de la espectrometría de masas orgánicas es fundamental en este tipo de estudios, utilizándose habitualmente la fuente de ionización de electrospray (ESI) o de ionización-desorción láser asistida por matriz (MALDI). La fuente ESI es más adecuada que la fuente MALDI para la espectrometría de masas en tándem y acoplamientos en línea con técnicas de separación (HPLC, CE), mientras que el MALDI es recomendable para muestras con matrices poco complejas. La diferencia principal entre ambas fuentes de ionización es la

INTRODUCCIÓN

sensibilidad del sistema ESI- MS a la concentración, conservándose tanto los enlaces covalentes como los no covalentes, mientras que el MALDI-MS lo es frente a la masa y solo las uniones covalentes se preservan. En la aplicación de la espectrometría de masas orgánicas en metalómica y metabolómica, se han utilizado diferentes analizadores como el triple cuadrupolo (QqQ), triple cuadrupolo tiempo de vuelo (QqQTOF), trampa de iones (IT), cuadrupolo-trampa (QTrap) o resonancia de ion ciclotrón con transformada de Fourier (FT- IRC) [219]. Indudablemente, la espectrometría de masas de alta resolución combinada con la espectrometría de masas en tándem (MSn) es una herramienta indispensable para la elucidación estructural.

Esta propuesta simplifica el tratamiento de muestra debido a la selectividad introducida por la presencia del metal, puesto que el detector atómico (ICP-MS) proporciona una dimensión extra al mecanismo de separación. Este hecho permite que los picos cromatográficos que contienen metal puedan ser distinguidos de otras señales presentes en detectores no atómicos. El detector ESI-MS proporciona información adicional sobre la identidad de picos en el caso de compuestos no conocidos para los que no se dispone de patrón comercial o se precisa de una identificación inequívoca. Por lo tanto, la presencia del metal en la molécula simplifica la estrategia analítica y presenta ventajas frente a los procedimientos proteómicos bien establecidos basados en moléculas enteras frente a la anterior centrada en el metal: metalómica.

Generalmente, como se ha comentado previamente, es necesario utilizar más de una técnica de separación debido a la complejidad de los bioligandos y de la matriz de la muestra, así como a las exigencias de la espectrometría de masas en relación a la pureza de las especies para poder llevar a cabo la identificación y caracterización estructural. Para asegurar la pureza de las metaloespecies se suelen utilizar sistemas cromatográficos ortogonales (complementarios). La estrategia más frecuente es utilizar primero la cromatografía de exclusión de tamaño acoplada a ICP-MS para detectar las especies del elemento de interés en función del peso molecular. Las fracciones separadas mediante SEC se separan posteriormente mediante cromatografía de intercambio aniónico, catiónico, fase reversa, interacción hidrofílica o CZE acoplada a ICPMS. Finalmente, las fracciones de interés pueden aislarse y analizarse mediante espectrometría de masas.

Los procedimientos analíticos que se han desarrollado para llevar a cabo los estudios metalómicos y estudios de metalobiomoléculas se describen a continuación:

6.1.1. Tratamiento de la muestra en metalómica

Un paso crítico en metalómica de los tejidos y fluidos biológicos es la preparación de la muestra. Este paso podría entenderse como cualquier manipulación que modifica la matriz de la

muestra con el fin de hacerlo más adecuado para el análisis. La preparación de muestras para metalómica partir de tejidos o fluidos biológicos requiere varios pasos:

(i) la disrupción celular o degradación parcial de la matriz de la muestra para su posterior extracción del analito mediante tratamientos mecánicos en presencia de nitrógeno líquido [57], como la criohomogeneización;

(ii) la extracción del analito y la solubilización asistidos por diferentes tampones, principalmente con fuerza iónica adecuada para el tipo de proteína presente en la muestra [55], por ejemplo Tris-tampón y acetato de amonio, siendo este último más adecuado para el análisis de muestras con ESI- MS debido a su mayor volatilidad [57];

(iii) la reducción de los enlaces disulfuro para promover la desnaturalización de las proteínas y para evitar errores en la asignación de la masa molecular y aún más la identificación. Para este propósito se utilizan agentes reductores conteniendo grupos de tiol libres tales como ditioneitol (DTT), ditioeritritol (DTE), glutatión reducido (GSH) y β -mercaptoetanol. Sin embargo, estos reactivos tienen propiedades quelantes de metales y están siendo reemplazados por otros, tales como tributilfosfina (TBP) y carboxietilfosfina tris- (TCEP) con propiedades reductoras suaves y sin propiedades quelantes [57]; y

(iv) la inhibición de las proteasas por medio de un inhibidor de proteasas sin propiedades quelantes, tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) [57]

Opcionalmente, cuando se requiere llevar a cabo la especiación de elementos es necesario la adición de detergentes, tal como SDS o 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), ya que el elemento se incorpora o acompleja por las biomoléculas y detergentes rompiendo las membranas celulares, rompiendo la interacción proteína- lípido y, en consecuencia, solubilizando las proteínas unidas a metales y previniendo las interacciones hidrofóbicas [220].

6.1.2. Determinación de la composición elemental de un sistema biológico

Como se ha comentado previamente, la técnica analítica más utilizada en los análisis de trazas de metales es la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), el esquema del equipo usado se muestra en la figura 19. Esta técnica se basa en la ionización de los componentes de la muestra por efecto de un plasma de argón, donde los iones producidos serán separados en base a su relación masa/carga en un espectrómetro de masas y posteriormente cuantificados por un detector multiplicador de electrones.

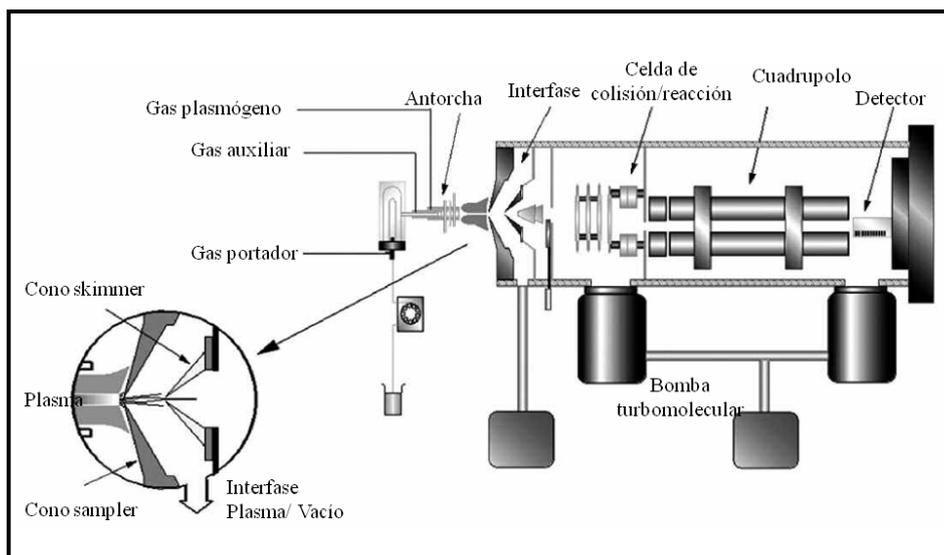


Figura 19. Esquema del equipo de ICP-ORC-MS con celda de colisión/reacción.

La técnica ofrece numerosas ventajas como son:

- Sencillez, rapidez, especificidad y extremada sensibilidad en la determinación de elementos traza y ultratrazo (límites de detección en el rango de $0,001 - 0,1 \text{ ngL}^{-1}$ para la mayoría de los elementos).
- Capacidad multielemental y multiisotópica (incluyendo no metales como S, Se y P).
- Rango dinámico muy amplio (6-8 órdenes de magnitud).
- Robustez respecto a la matriz analizada. La señal obtenida es independiente de la estructura de la especie, de la matriz en la que se encuentre y del disolvente utilizado en la disolución, siendo directamente proporcional a la masa del elemento [221-222].

Por estas razones, el ICP-MS ha remplazado prácticamente a otras técnicas como la espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), la fluorescencia de rayos-X (XRF) y el análisis por activación neutrónica (INAA), usados para la determinación multielemental de elementos trazas. Además proporciona un alto rendimiento en el análisis, llegando a usar pequeñas cantidades de muestra (microlitro o sub-microlitro) en análisis en continuo o en modo inyección en flujo usando micro- o nanonebulizadores [223-224].

La técnica ICP-MS sufre ciertas interferencias en un número considerable de isótopos, las cuales podrán ser eliminadas mediante el uso de una celda de colisión/reacción. Las fuentes de errores más comunes son la transferencia de elementos de forma no cuantitativa a las soluciones, requiriendo una cuidadosa optimización de la digestión de la muestra y una mínima contaminación de las mismas.

6.1.3. Análisis del contenido de metalobiomoléculas o de metales unidos a metalobiomoléculas

Los procedimientos analíticos deben producir una señal específica para cada biomolécula que contenga uno o varios metales, permitiendo así su detección, identificación y cuantificación.

Las metalobiomoléculas pueden ser analizadas directamente en la muestra sólida, por ejemplo mediante espectroscopia de absorción de rayos X (XAS) o ablación láser acoplada a ICP-MS (LA-ICP-MS). En un extracto de la muestra las metalobiomoléculas se pueden estudiar mediante espectrometría de masas molecular con fuente de ionización por electrospray (ESI-MS). Pero se obtiene una mayor resolución y sensibilidad cuando usamos estas técnicas acopladas a una previa fase de separación ya sea cromatográfica o electroforética.

Generalmente se utilizan dos o tres sistemas cromatográficos complementarios con el objetivo de reducir la complejidad de la muestra para el estudio metalómico como etapa previa a la identificación mediante espectrometría de masas. El análisis mediante espectrometría de masas se realiza frecuentemente tras una digestión de las metaloproteínas en la muestra con una enzima proteolítica adecuada. La ventaja de utilizar dos dimensiones cromatográficas reside en su potencial para mejorar sustancialmente la capacidad de separación cromatográfica. Los modos de separación cromatográfica más utilizados incluyen RP, IEC, SEC y HILIC. Los sistemas bidimensionales SCX-RP, HILIC-RP, y RP-RP han dado buenos resultados en este tipo de análisis. El sistema RP-RP utilizando diferencias significativas en cuanto a pH en ambas columnas, ofrece una elevada capacidad de pico en cromatografía líquida bidimensional [225-226]

6.1.4. Técnicas de separación cromatográficas.

A pesar de la baja resolución que normalmente se consigue con la SEC, esta separación cromatográfica se encuentra entre las más utilizadas, generalmente como la primera dimensión. De esta forma se consiguen eliminar polímeros biológicos de masa molecular superior a 100 kDa y una eliminación parcial de las sales. Las fracciones que contienen metales o metaloides se fraccionan posteriormente mediante otro mecanismo de separación [216]. Por todo lo comentado anteriormente, la SEC acoplada a ICP-MS es hoy en día la técnica más favorable para una rápida detección semi-cuantitativa de la presencia de metalobiomoléculas en muestras biológicas [227].

Dicho acoplamiento SEC-ICP-MS nos permite separar metaloproteínas en función de su masa molecular y determinar el heteroátomo que contiene aprovechando la alta sensibilidad que presenta el ICP-MS y la simplicidad de la interfase requerida para dicho acoplamiento.

INTRODUCCIÓN

Los rellenos utilizados para la SEC están constituidos por pequeñas partículas poliméricas o de sílice que contienen una red de poros uniforme en los que pueden difundir las moléculas del soluto y del disolvente. Las moléculas son atrapadas eficazmente en los poros y eliminadas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos. Siendo las primeras en eluir las moléculas de mayor tamaño, ya que no quedan retenidas y viceversa [228] como se observa en la figura 20.

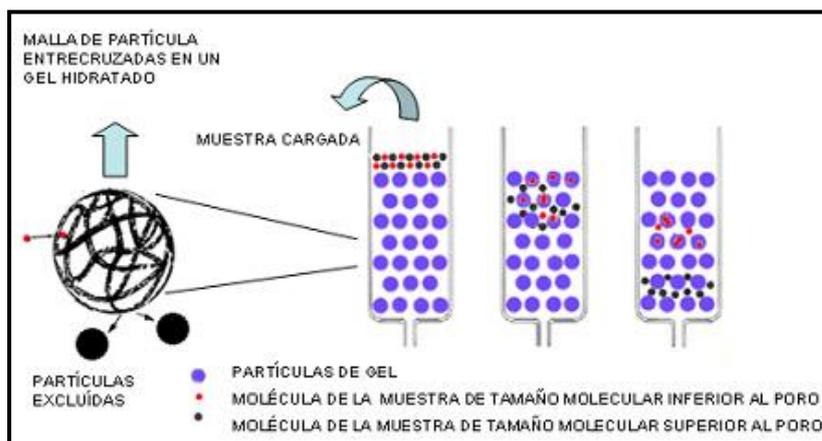


Figura 20. Representación gráfica de la elución en SEC.

Mediante la SEC podemos analizar muestras bastante concentradas (citosol diluido de 3 a 5 veces) requiriendo unas condiciones de separación no desnaturizantes. Las principales desventajas son que obtenemos una baja resolución y la pureza de los picos obtenidos es pobre. Además, el control de los iones metálicos adsorbidos en la fase estacionaria es importante ya que pueden intercambiar con metales ya complejados o pueden ser rescatados por ligandos de la muestra, lo que produce picos fantasmas. Por todo ello por lo que requiere una limpieza complementaria mediante otro tipo de cromatografía no desnaturizante por cromatografía de intercambio aniónico (AEC) para el análisis de metaloproteínas [229] y de cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) para el análisis de metabolitos que contienen metales [230].

En el presente estudio se utilizará la cromatografía de intercambio aniónico, la cual se basa en la atracción entre los aniones del soluto y los centros cargados positivamente unidos a la fase estacionaria [228] como se muestra en la figura 21.

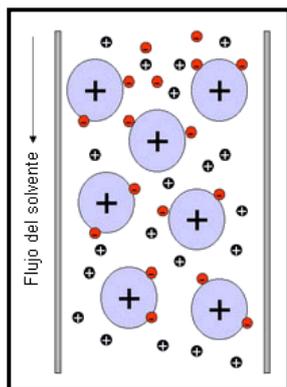


Figura 21. Representación gráfica de la cromatografía de intercambio iónico.

En AEC los péptidos y proteínas cargadas quedan retenidos por interacciones electrostáticas sobre la resina de intercambio y son eluidos mediante variaciones de pH o de fuerza iónica de la fase móvil [228]. Con esta técnica se consigue una mayor resolución que con SEC, y puede ser acoplada a un espectrómetro de masas con fuente de electrospray para su posterior identificación.

6.2. Metabolómica

6.2.1 Espectrometría de masas vs Resonancia magnética nuclear

La metabolómica requiere de metodologías robustas y reproducibles, con una elevada sensibilidad y precisión que permitan el análisis integral del metaboloma. Para ello se han propuesto numerosas plataformas analíticas, entre las que destacan la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*), aunque también se han aplicado otras muchas técnicas como la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, *Fourier transform-infrared spectroscopy*) y la espectroscopia Raman [231], así como métodos cromatográficos con detectores distintos a RMN y MS, como por ejemplo el detector de ionización de llama [232].

La RMN ha sido ampliamente utilizada en el campo de la metabolómica debido a su elevada reproducibilidad, carácter no destructivo, requerimientos mínimos de preparación de muestras y rapidez de análisis. Una de las grandes ventajas que presenta frente a otras plataformas metabolómicas es su capacidad para llevar a cabo la identificación estructural de metabolitos, normalmente mediante el empleo de librerías de espectros. Además, es una técnica no discriminante ya que la sensibilidad en RMN no depende de las características físico-químicas de los analitos, como la polaridad o propiedades ácido-base, posibilitando el análisis de un amplio rango de metabolitos [233]. Sin embargo, una de las grandes limitaciones de la resonancia magnética es su baja sensibilidad, limitando su aplicabilidad al estudio de

INTRODUCCIÓN

metabolitos de abundancia media-alta. Además, el análisis de muestras complejas produce espectros con un gran número de señales que pueden solapar en un rango pequeño de desplazamientos químicos (≈ 10 ppm), lo que dificulta la identificación de metabolitos individuales.

Alternativamente, la elevada sensibilidad y especificidad de la espectrometría de masas, junto con la capacidad que posee de llevar a cabo estudios tanto cuantitativos como cualitativos, la han convertido en una técnica con un gran potencial en metabolómica [234]. Además, la MS presenta un amplio rango de aplicabilidad gracias a las múltiples configuraciones instrumentales que pueden emplearse, incluyendo la aplicación paralela de diversos métodos de introducción de muestra (cromatografía líquida y gaseosa, electroforesis capilar) y mecanismos de ionización (electrospray, ionización química), lo cual permite expandir la cobertura analítica del metaboloma. Así, aunque las técnicas basadas en MS normalmente requieren de una etapa de tratamiento de muestra más compleja, y la selección de las condiciones experimentales (*e.g.* sistema de introducción de muestras, fuente de ionización) conlleva la introducción de un sesgo analítico inherente, la MS se ha establecido como la herramienta idónea para la caracterización metabólica de sistemas complejos.

6.2.2 Diseño de un experimento metabolómico basado en espectrometría de masas

Teniendo en cuenta la elevada complejidad del metaboloma, el diseño experimental de un estudio metabolómico es crítico para asegurar resultados fiables y robustos. El esquema de trabajo convencional en un experimento metabolómico integra una serie de etapas genéricas, como se esquematiza en la figura 22, entre las que se incluyen la recogida y tratamiento de muestras, el análisis metabolómico, el procesado y análisis estadístico de los datos y por último la identificación de los metabolitos discriminantes y la interpretación de los resultados.

Todas estas etapas deben ser validadas y optimizadas en función de los objetivos específicos del estudio, prestándose una especial atención a la eliminación de posibles sesgos que puedan conducir a resultados parciales o erróneos. Además, debido al carácter no cuantitativo de las técnicas ómicas, basadas en el análisis comparativo, los métodos metabolómicos deben ser altamente reproducibles con el fin de minimizar la variabilidad intermuestral, y facilitar así la búsqueda de metabolitos discriminantes entre los grupos de estudio. En cualquier caso, la elevada heterogeneidad del metaboloma normalmente hace necesario el empleo de múltiples plataformas analíticas complementarias para conseguir una cobertura metabolómica global, como se describe en los siguientes apartados.

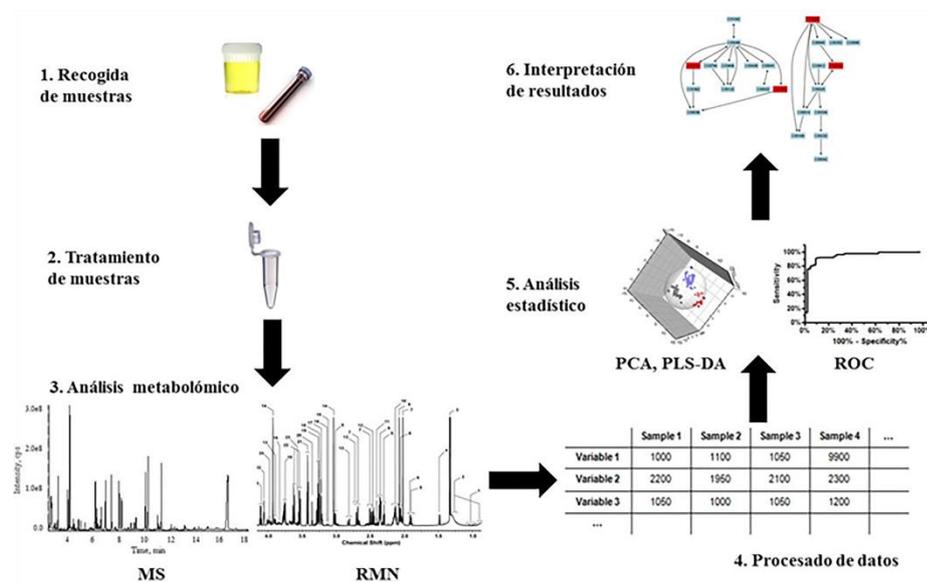


Figura 22. Esquema de trabajo simplificado de un experimento metabolómico.

I. RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS

En metabolómica pueden emplearse numerosos tipos de muestras biológicas, incluyendo tejidos y células, cada uno de los cuales posee un metaboloma característico. El tamaño poblacional es un factor clave para reducir la influencia de la variabilidad biológica intermuestral y así poder obtener datos válidos estadísticamente [235]. En experimentos de laboratorio (*e.g.* ensayos de exposición en animales modelo), donde las condiciones experimentales están altamente controladas, el número de muestras suele ser pequeño ya que el factor estudiado es la única variable aleatoria.

Tras la recogida de las muestras, éstas deben ser sometidas a un proceso de desactivación metabólica (*quenching*) para evitar que los metabolitos sufran posteriores transformaciones. Esto normalmente se consigue mediante una disminución brusca de la temperatura con nitrógeno líquido, mientras que en estudios con líneas celulares suelen emplearse disolventes orgánicos o soluciones salinas para evitar la fuga de metabolitos por ruptura celular [234].

Por último, los procedimientos de tratamiento de muestra empleados en metabolómica deben ser simples y universales para evitar la introducción de sesgos (*e.g.* pérdidas de metabolitos, empleo de procesos de extracción selectivos)[236]. En el caso de tejidos es necesaria la liberación de los metabolitos intracelulares mediante homogeneización y lisis celular, mientras que el tratamiento de fluidos biológicos normalmente se ve limitado a una etapa de desproteinización y/o dilución para reducir el efecto matriz [237].

INTRODUCCIÓN

II. TÉCNICAS DE ANÁLISIS BASADAS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Como se ha descrito anteriormente, no existe ninguna técnica analítica que permita estudiar la totalidad del metaboloma de forma simultánea, siendo necesario el empleo de diferentes plataformas complementarias para conseguir una amplia cobertura analítica. En este sentido, la espectrometría de masas presenta un gran potencial gracias a las múltiples conformaciones instrumentales existentes, entre las que se incluyen distintos sistemas de introducción de muestra, fuentes de ionización y analizadores de masas.

a) INTRODUCCIÓN DE MUESTRA

Las plataformas metabolómicas más empleadas en la actualidad se basan en el acoplamiento de distintas técnicas de separación a un espectrómetro de masas, entre las que destacan la cromatografía líquida (LC, *liquid chromatography*), la cromatografía de gases (GC, *gas chromatography*) y la electroforesis capilar (CE, *capillary electrophoresis*)[238-239].

El acoplamiento GC-MS fue desarrollado mucho antes de la introducción de otras técnicas basadas en separaciones en fase líquida gracias a la compatibilidad entre la cromatografía de gases y la espectrometría de masas, ya que ambas operan en fase gaseosa. Por ello, esta plataforma ha jugado un papel muy relevante en los inicios de la metabolómica. En general, la mayoría de los métodos metabolómicos basados en GC-MS emplean ionización por impacto electrónico (EI, *electron impact*), y en menor medida ionización química (CI, *chemical ionization*). La separación cromatográfica normalmente se lleva a cabo en columnas capilares con fase estacionaria de polaridad baja (5% difenil-polidimetilsiloxano) o media (50% difenil-polidimetilsiloxano), haciendo uso de programas de temperatura prolongados que comienzan con temperaturas inferiores al punto de ebullición del disolvente, hasta alcanzar 300-320°C. Alternativamente, los métodos cromatográficos bidimensionales (GC×GC-MS) permiten aumentar la eficiencia de la separación en muestras complejas. Para ello, cada pico eluyente de una primera columna, normalmente no polar, se transfiere a una segunda columna (polar), lo que permite llevar a cabo separaciones en función tanto de la volatilidad como de la polaridad de los metabolitos analizados. Una de las ventajas más importantes del acoplamiento GC-MS es su capacidad para identificar picos desconocidos mediante el empleo de librerías de espectros, lo cual es posible gracias a la reproducibilidad que se consigue en los procesos de fragmentación mediante el uso de EI. Además, la reproducibilidad y resolución cromatográfica es por lo general superior a la que se obtiene con otros acoplamientos como LC-MS y CE-MS. Sin embargo, la mayor limitación de esta plataforma es que está restringida al análisis de compuestos volátiles y térmicamente estables, lo cual normalmente requiere de una etapa previa de derivatización que puede introducir una mayor variabilidad técnica y complejidad analítica. Por lo tanto, el acoplamiento GC-MS solo puede emplearse para obtener perfiles metabolómicos de compuestos de bajo peso molecular.

La introducción de las fuentes de ionización a presión atmosférica (API, *atmospheric pressure ionization*) en la década de 1990 permitió el desarrollo de los acoplamientos LC-MS, los cuales muestran un mecanismo de separación complementario a GC-MS. A pesar de que la supresión iónica es un problema importante en LC-MS, esta plataforma se ha convertido en la herramienta metabolómica más empleada hoy día gracias a su amplio rango de aplicabilidad. En este sentido, las técnicas basadas en LC-MS permiten analizar compuestos de naturaleza química muy diversa, desde metabolitos de bajo peso molecular hasta compuestos de mayor tamaño como lípidos, péptidos o sacáridos, para lo cual pueden emplearse diversas fases cromatográficas con mecanismos de retención complementarios. La cromatografía de fase reversa (RP, *reversed phase*) es la modalidad más empleada en metabolómica ya que la mayoría de los metabolitos conocidos son de naturaleza hidrofóbica (>70%), principalmente lípidos (*e.g.* fosfolípidos, esteroides, glicerolípidos).

Por el contrario, el análisis de la fracción metabólica polar normalmente se lleva a cabo mediante cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC, *hydrophilic interaction chromatography*), una técnica similar a la cromatografía en fase normal (NP, *normal phase*) en la que la fase móvil no acuosa empleada en NP se reemplaza por un eluyente que contiene disolventes orgánicos miscibles con el agua, lo cual facilita su acoplamiento a MS. Una alternativa para el análisis del metaboloma polar es el empleo de reactivos de pares iónicos, que permiten separar metabolitos hidrofílicos en fases estacionarias hidrofóbicas. La cromatografía líquida abarca una amplia gama de distintos sistemas instrumentales atendiendo a la longitud de la columna y el tamaño de partícula.

Las técnicas convencionales basadas en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) han sido extensamente aplicadas en metabolómica, pero la resolución cromatográfica que proporciona no es suficiente para resolver la elevada complejidad del metaboloma. Por ello, algunos autores han propuesto el uso de la cromatografía líquida capilar para conseguir una mayor sensibilidad y resolución, así como menores requerimientos de cantidad de muestra y disolventes [238]. Sin embargo, estas columnas poseen una limitada capacidad de carga, lo cual es incompatible con el análisis integral de la totalidad del metaboloma. Actualmente, la plataforma más empleada en metabolómica es la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC, *ultra high-performance liquid chromatography*), la cual permite realizar separaciones más eficientes gracias al uso de fases estacionarias con tamaño de partícula inferior a 2 μm . Así, se ha demostrado que la UHPLC mejora la reproducibilidad de la separación cromatográfica, aumenta la sensibilidad y resolución de pico, y reduce el tiempo total de análisis [240].

INTRODUCCIÓN

Por último, el acoplamiento CE-MS ha demostrado un gran potencial para el análisis de metabolitos altamente polares e iónicos, los cuales no pueden resolverse mediante GC-MS o LC-MS. Algunas de las ventajas que presenta esta técnica son su elevada resolución de separación y el requerimiento de pequeños volúmenes de muestra con un pre-tratamiento mínimo [241]. Además, la disponibilidad de múltiples modos de separación permite abordar de forma más exhaustiva el estudio de la totalidad del metaboloma, entre los que destacan la electroforesis capilar de zona (CZE, *capillary zone electrophoresis*), cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC, *micellar electrokinetic capillary chromatography*) y la electrocromatografía capilar (CEC, *capillary electrochromatography*). Sin embargo, la aplicación de esta plataforma no es tan común en metabolómica como GC/LC-MS debido a la irreproducibilidad en los tiempos de migración y a la dificultad de acoplar CE con MS, lo cual repercute en una baja robustez analítica. A pesar de estas limitaciones, CE-MS está emergiendo en los últimos años como una herramienta metabolómica complementaria a tener en cuenta, con un gran potencial para la caracterización del metaboloma polar en muestras con un gran contenido acuoso (*e.g.* orina, LCR).

La aplicación de estas técnicas cromatográficas y electroforéticas previas a la detección por MS permite resolver un gran número de metabolitos, y facilita la identificación y cuantificación de los mismos gracias al conocimiento de la masa exacta, espectros de fragmentación y tiempos de retención/migración. Sin embargo, estos acoplamientos presentan una serie de limitaciones asociadas al elevado tiempo de análisis y el requerimiento de un control exhaustivo de las condiciones de separación para asegurar una buena reproducibilidad analítica, lo que ha conducido al desarrollo de metodologías complementarias con un mayor rendimiento analítico. Entre ellas destacan las técnicas de introducción directa de muestras en MS, ya sea mediante *infusión directa* (DI, *direct infusion*) o análisis por inyección en flujo (FIA, *flow injection analysis*) [242], y en menor medida las técnicas de ionización ambiental, que permiten el análisis directo de muestras sólidas o aerosoles líquidos sin necesidad de ningún pretratamiento [243]. Estas plataformas metabolómicas de análisis directo permiten un procesamiento de muestras más rápido, lo cual reduce la deriva instrumental a lo largo del periodo de análisis y en consecuencia aumenta la reproducibilidad inter-muestral. Además, la ausencia de una etapa previa de separación cromatográfica/electroforética posibilita la determinación de múltiples metabolitos de naturaleza muy diversa, ya que se evita el sesgo analítico inherente asociado a la selectividad de los mecanismos de retención de las distintas técnicas de separación.

Por último, cabe destacar que la introducción directa de muestras en MS facilita el diseño del experimento metabolómico en términos de una mayor *simplicidad instrumental* (evitándose problemas asociados al deterioro gradual de columnas y capilares), y del posterior

procesado de datos. Sin embargo, estas técnicas también presentan importantes inconvenientes relacionados con la imposibilidad de diferenciar compuestos isobáricos, la dificultad de obtener datos cuantitativos debido a la presencia de supresión iónica y la detección de iones producidos mediante fragmentación *in-source*. A pesar de estas limitaciones, las técnicas basadas en DI/FIA-MS han demostrado ser una herramienta idónea para realizar un primer *screening* metabolómico rápido y sencillo.

b) TÉCNICAS DE IONIZACIÓN

Otro gran potencial del empleo de la espectrometría de masas en metabolómica es la disponibilidad de múltiples técnicas de ionización complementarias, como se muestra en la figura 23. De este modo, aunque cada una de estas técnicas individuales introduce un sesgo analítico inherente al mecanismo de ionización, la combinación de distintas metodologías permite obtener una visión más completa del metaboloma [244-246].

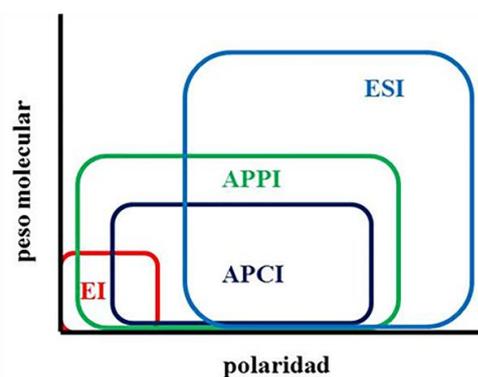


Figura 23. Complementariedad de las técnicas de ionización más empleadas en metabolómica.

El impacto electrónico (EI) es la técnica de ionización comúnmente aplicada en GC-MS, en la cual los analitos son ionizados mediante una corriente de electrones emitidos desde un filamento que al interactuar con los compuestos en fase gaseosa provoca la formación de iones radicales mediante la pérdida de un electrón (M^{+}). Además, el empleo de una alta energía de ionización (normalmente 70 eV) provoca que el proceso de ionización vaya acompañado por la fragmentación de los analitos. Estos patrones de fragmentación son característicos de cada metabolito, lo cual facilita la identificación de compuestos en los perfiles GC-MS mediante el empleo de librerías de espectros. Alternativamente, la ionización química (CI) puede emplearse para determinar el ión molecular, habitualmente ausente en los espectros EI-MS debido a la alta fragmentación, aunque su uso en metabolómica no se encuentra tan extendido.

INTRODUCCIÓN

En el caso de las plataformas metabolómicas basadas en sistemas de introducción de muestra en fase líquida (*i.e.* LC-MS, CE-MS, DI/FIA-MS) pueden emplearse diversas fuentes de ionización a presión atmosférica. Estas técnicas de ionización permiten obtener iones cargados positiva o negativamente dependiendo del potencial eléctrico aplicado y de las propiedades físico-químicas de los metabolitos, por lo que generalmente los análisis metabolómicos se realizan por duplicado empleando ambos modos de ionización para conseguir una visión más completa del metaboloma investigado.

La técnica más común es el electrospray (ESI, *electrospray ionization*), gracias a su elevada sensibilidad, capacidad de ionizar compuestos en un amplio rango de masas y polaridades, así como su fácil acoplamiento a LC, CE o DI/FIA. En la fuente ESI, la ionización de los metabolitos se produce mediante reacciones ácido-base (*e.g.* $[M+H]^+$, $[M-H]^-$) o de coordinación (*e.g.* $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Cl]^-$, $[M+HCOO]^-$), y posterior electro-nebulización para liberar los iones desolvatados. La ionización por electrospray normalmente opera a flujos de introducción de muestra de $\mu\text{L min}^{-1}$, pero la modalidad de nanoelectrospray (nESI) permite introducir menores caudales (nL min^{-1}), lo que facilita el proceso de desolvatación y mejora la sensibilidad. Sin embargo, la nESI no se ha aplicado de forma rutinaria en metabolómica.

Una segunda alternativa es la ionización química a presión atmosférica (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*), donde la fase móvil se vaporiza e ioniza mediante una descarga en corona, generándose iones reactivos que pueden transferir la carga a los metabolitos en fase gaseosa. Esta técnica de ionización es complementaria a ESI, ya que es más adecuada para el análisis de metabolitos de menor polaridad y además es menos susceptible a efectos de matriz.

Por último, la fotoionización a presión atmosférica (APPI, *atmospheric pressure photoionization*) permite ampliar la gama de compuestos analizables en MS ya que es capaz de ionizar compuestos tanto polares como no polares mediante distintos mecanismos de ionización, por lo que puede considerarse como una fuente de ionización universal. Además, presenta una baja susceptibilidad a la supresión iónica, un amplio rango lineal, y requiere menor temperatura que APCI para la desolvatación, permitiendo el análisis de compuestos térmicamente lábiles. La fuente APPI emplea una lámpara de fotoionización y un flujo de dopante para formar iones radicales que pueden ionizar directamente los metabolitos no polares mediante reacciones de intercambio de carga.

c) ANALIZADORES DE MASAS

El analizador de masas es otro componente a tener en cuenta cuando se diseña un experimento metabolómico basado en MS [247], ya que repercute directamente en aspectos analíticos tan importantes como la sensibilidad, resolución y exactitud de masa, y la velocidad

de adquisición de espectros, lo cual es clave para la detección de picos estrechos (*e.g.* GC-MS, UHPLC-MS).

Los analizadores de masas nominales, como el cuadrupolo (Q, *quadrupole*) o la trampa de iones (IT, *ion trap*), son extremadamente robustos y reproducibles, y ofrecen un rápido escaneo en amplios rangos de masas. Sin embargo, las plataformas metabolómicas más empleadas en la actualidad se basan en la espectrometría de masas de alta resolución, la cual permite obtener perfiles metabolómicos más resueltos y facilitan la posterior identificación de los metabolitos.

El tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*) es el analizador de alta resolución más sencillo, el cual ofrece una elevada sensibilidad, exactitud de masa (5 ppm) y capacidad de escaneo rápido. Alternativamente, el sistema híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) combina la estabilidad del cuadrupolo con la elevada resolución del analizador TOF, lo que le confiere una mayor exactitud de masa y permite llevar a cabo experimentos de fragmentación MS/MS [248].

Por último, los analizadores Orbitrap y de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR, *Fourier transform ion cyclotron resonance*) proporcionan la mayor resolución y exactitud de masa, pero tienen un coste muy superior a los sistemas convencionales basados en TOF.

III. PRE-PROCESAMIENTO DE DATOS METABOLÓMICOS

Los experimentos metabolómicos generan grandes conjuntos de datos de una elevada complejidad, los cuales deben ser organizados en forma de matrices bidimensionales para facilitar su posterior análisis estadístico e interpretación. Para llevar a cabo este pre-procesamiento de los datos, en la actualidad existen numerosos softwares, tanto de acceso libre (XCMS, MZmine) como desarrollados por los propios fabricantes de sistemas MS (MassHunter, Agilent; MarkerLynx, Waters; MarkerView, AppliedBiosystems).

El procedimiento típico para procesar los datos metabolómicos obtenidos mediante técnicas basadas en acoplamientos con MS (*i.e.* GC-MS, LC-MS, CE-MS) consta de varias etapas (detección de picos, alineamiento y normalización) [249]. Por el contrario, el tratamiento de datos en DI/FIA-MS es mucho más simple ya que la ausencia de una separación cromatográfica hace innecesario llevar a cabo la etapa de alineamiento. De este modo, el pre-procesamiento se ve limitado a la búsqueda de los picos presentes en los espectros de masas por encima de un umbral de ruido instrumental.

IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS METABOLÓMICOS

La interpretación de los datos obtenidos en un estudio metabolómico requiere de la aplicación de herramientas estadísticas avanzadas, debido al elevado número de muestras y variables analizados en estos experimentos. Normalmente, este tratamiento de datos se basa en el empleo de técnicas de análisis multivariante, las cuales permiten reducir la elevada complejidad de las matrices de datos metabolómicas. Sin embargo, estos resultados deben ser posteriormente validados mediante otras técnicas clásicas de análisis univariante.

Antes de llevar a cabo el análisis estadístico es esencial hacer un pre-tratamiento de los datos para minimizar posibles fuentes de variabilidad técnica inter-muestral, y así facilitar la obtención de resultados biológicamente válidos. Las etapas más importantes de este pre-tratamiento son la transformación, el escalado y la imputación de los valores perdidos (*missing values*). La transformación de los datos, normalmente logarítmica, permite corregir la heterocedasticidad, convertir relaciones multiplicativas en aditivas, y aproximar distribuciones asimétricas a la normalidad [250]. Por el contrario, los métodos de escalado permiten reducir la importancia relativa de las variables mayoritarias frente a las minoritarias, los cuales se basan en dividir cada variable por un factor de corrección denominado factor de escalado. El método más empleado en metabolómica es el escalado de Pareto, donde el factor de escalado empleado es la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable. Por último, la detección de *missing values* en metabolómica basada en MS es muy común, y puede tener múltiples orígenes (*e.g.* heterogeneidad entre muestras, problemas técnicos, metabolitos minoritarios). Estos *missing values* pueden interferir negativamente en el posterior tratamiento estadístico de los resultados, por lo que se han propuesto distintos métodos para llevar a cabo su imputación [251].

Tras este pre-tratamiento, una gran variedad de técnicas multivariantes pueden ser empleadas para extraer la información biológica de estos datos, entre las que destacan las técnicas de proyección, basadas en la conversión de una matriz de datos multidimensional en un modelo simplificado gracias a la reducción del elevado número de variables mediante la obtención de nuevas componentes, combinaciones de las originales [252]. Estos modelos permiten detectar valores atípicos (*outliers*), así como visualizar agrupaciones y tendencias entre los distintos grupos de estudio, facilitando la interpretación de los resultados.

Una de las herramientas más empleadas en metabolómica es el análisis de componentes principales (PCA, *principal component analysis*), un método no supervisado donde el modelo estadístico se construye sin un conocimiento previo de la pertenencia de las distintas muestras a cada grupo de estudio. El PCA suele aplicarse como un primer paso exploratorio para evaluar de forma preliminar la calidad de los datos, pero normalmente se requiere del empleo de técnicas supervisadas para mejorar la separación entre grupos y así poder identificar las variables

discriminantes. Entre los métodos supervisados, donde el modelado se realiza con un conocimiento previo de la existencia de distintas clases, cabe destacar el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA, *partial least squares discriminant analysis*).

Aunque estas técnicas multivariantes presentan un gran potencial para llevar a cabo la clasificación de grupos y la selección de posibles metabolitos discriminantes, los resultados obtenidos deben ser validados mediante la aplicación de otras técnicas complementarias. Una forma de evaluar el poder discriminante de estos metabolitos es mediante el empleo de herramientas estadísticas univariantes paramétricas, como el test t de Student o el análisis de la varianza (ANOVA, *analysis of variance*), o no paramétricas (*e.g.* Mann-Whitney, Kruskal-Wallis). Sin embargo, la técnica más empleada para descubrir potenciales biomarcadores es el análisis de curvas características operativas del receptor (ROC, *receiver operating characteristic*). La curva ROC es una representación gráfica de la sensibilidad de un posible marcador frente a (1-especificidad), de modo que el área bajo esta curva (AUC, *area under the curve*) puede emplearse para evaluar su potencial diagnóstico [253]. De este modo, un biomarcador se considera excelente cuando el valor de AUC supera 0.9, bueno si se encuentra en el rango 0.8-0.9, moderado entre 0.7-0.8 y pobre si AUC es menor a 0.7.

V. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS

Una vez se han seleccionado las señales discriminantes mediante la aplicación de herramientas estadísticas, estos metabolitos marcadores deben ser identificados. En el caso de metabolómica basada en MS de alta resolución, la elucidación estructural puede llevarse a cabo mediante el conocimiento de la masa exacta y los perfiles de fragmentación. Para ello, existen numerosas bases de datos que permiten realizar la identificación mediante la comparación con espectros de referencia. En GC-EI-MS, el uso de librerías es muy común gracias a la elevada reproducibilidad del proceso de fragmentación por impacto electrónico, entre las que destaca la librería del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, *National Institute of Standards and Technology*). Por el contrario, los espectros de fragmentación obtenidos mediante API-MS varían según el tipo de fuente de ionización y el analizador de masas empleado, lo que ha dificultado el desarrollo de librerías para la identificación de metabolitos detectados en LC/CE/DI-MS.

Sin embargo, actualmente existen distintas bases de datos metabolómicas de acceso libre que facilitan este proceso de identificación, como la Human Metabolome DataBase (HMDB, <http://www.hmdb.ca>), Metlin(<http://metlin.scripps.edu>), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg>) o LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org>). Además, cabe destacar que la elucidación estructural de compuestos lipídicos es por lo general más sencilla que la identificación de metabolitos de bajo peso molecular, gracias al

INTRODUCCIÓN

conocimiento de los perfiles característicos de fragmentación de las distintas familias de lípidos, como por ejemplo fosfolípidos [254], derivados del colesterol [255] o glicerolípidos [256].

Tras esta identificación mediante el uso de bases de datos, la *Metabolomics Standards Initiative* (MSI) establece que una identificación definitiva requiere del empleo de patrones auténticos para confirmar, al menos, dos características independientes (*e.g.* masa exacta, perfil de fragmentación, tiempo de retención/migración) [257]. Sin embargo, esta metodología no siempre es posible, ya que muchos metabolitos no están disponibles comercialmente o no tienen la pureza necesaria para su análisis por MS [258].

VI. ROBUSTEZ DEL PROCEDIMIENTO METABOLÓMICO

La robustez del procedimiento analítico es un requerimiento básico en metabolómica para asegurar que la variabilidad técnica es menor a la variabilidad inter-muestral, y así poder extraer información biológica válida de los datos obtenidos. La estrategia más común para llevar a cabo la validación de los procedimientos metabolómicos se basa en el empleo de muestras de control de calidad (QC, *quality control*). Estas muestras QC normalmente se preparan mezclando alícuotas de cada una de las muestras individuales, y luego se analizan al principio de la secuencia de análisis para equilibrar el sistema, así como en puntos intermitentes a lo largo de la secuencia para monitorizar la estabilidad instrumental [259].

Una forma directa de evaluar la reproducibilidad instrumental es mediante el empleo de técnicas de análisis multivariante no supervisadas, como el PCA, y la inspección de los correspondientes gráficos de puntuaciones (*scores plots*). Como la variabilidad biológica entre QCs es nula, y la única dispersión posible es la debida a factores técnicos, estas muestras deben quedar estrechamente agrupadas en el PCA (figura 24A) [260]. Además, la predicción de estas muestras QC en modelos supervisados (*e.g.* PLS-DA) debe causar su clasificación en el centro del gráfico de puntuaciones, ya que su composición es un promedio de la de los distintos grupos investigados (figura 24B).

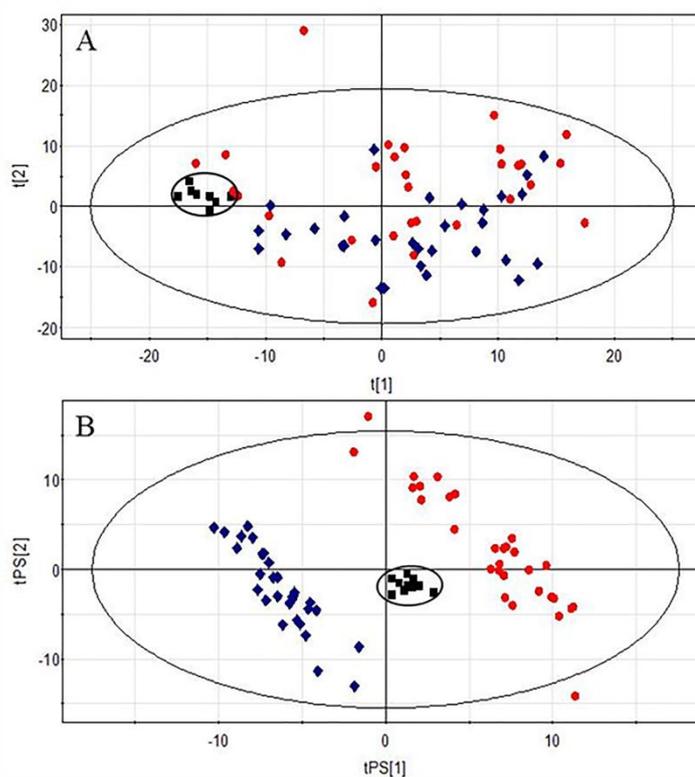


Figura 24. Validación de un método metabolómico mediante el empleo de muestras de control de calidad (cuadrados negros). (A) Agrupación de QCs en PCA; (B) predicción de QCs en PLS-DA.

Alternativamente, otra estrategia para evaluar la robustez de un experimento metabolómico es la determinación del coeficiente de variación para distintos metabolitos en muestras QC. Así, los criterios definidos por la Administración de Alimentos y Medicamentos del gobierno de los Estados Unidos (*US Food and Drug Administration*, FDA) establecen un límite de variabilidad del 30% para la validación de procedimientos analíticos no dirigidos [261].

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bernal MP, Clemente, R, Vazquez S, Walker, DJ. Aplicación de la Fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar. *Revista Ecosistemas*. 2007; 16: 67-76.
- [2] Calamari D. Assessment of persistent and bioaccumulating chemicals in the aquatic environment. *Toxicology*. 2002; 181-182:183-186.
- [3] Marchini S. Aquatic effects assessment: needs and tools. *Ann. Ist. Super Sanita*. 2002; 38:119-129.
- [4] Steinberg CEW, Geyer HJ., Kettrup AAF. Evaluation of xenobiotic effects by ecological techniques. *Chemosphere*. 1994; 28:357-374.
- [5] Dix HM. *Environmental Pollution*. New York, United States: Ed John Willey & Sons; 1981.
- [6] Livingstone DR. *Persist pollutants in marine invertebrates*. Oxford, Pergamon Press; 1992. p. 3-34
- [7] Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB. *Principles of Ecotoxicology*. London: Taylor & Francis; 1997.
- [8] Manahan SE. *Environmental Chemistry*. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers; 2000.
- [9] Galloway TS, Sanger RC, Smith KL, Fillmann G, Readman JW, Ford TE et al. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environ. Sci Technol*. 2002; 36: 2219-2226.
- [10] López-Barea J, Pueyo C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutat Res*. 1998; 399: 3-15.
- [11] Rodríguez-Ortega MJ, Grosvik BE, Rodríguez-Ariza A, Goksoyr, A, Lopez-Barea, J. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. *Proteomics*. 2003; 3:1535-1543.
- [12] Livingstone DR. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull*. 2001; 42:656–666.
- [13] O'Neill AJ, Galloway TS, Browne MA, Dissanayake A, Depledge MH. Evaluation of toxicity in tributaries of the Mersey estuary using the isopod *Asellus aquaticus* (L.). *Mar Environ Res*. 2004; 58:327-331.

INTRODUCCIÓN

- [14] Hagger JA, Depledge MH, Galloway TS. Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar Pollut Bull.* 2005; 51:811-816.
- [15] Connell DW. *Basic Concepts of Environmental Chemistry*. Florida, Estados Unidos: CRC Press. Boca Ratón; 2005.
- [16] Barrenetwa CO, Serrano AP, Delgado MNG, Vidal FJR, Blanco JMA. () *Contaminación Ambiental. Una visión desde la Química*. Madrid, España: Thomson Editores, Paraninfo S. A; 2003.
- [17] Nriagu JO, Simmons MS. *Environmental Oxidants*. Londres, Reino Unido: Ed. Taylor and Francis.; 1994.
- [18] Wase J, Foster C. *Biosorbents for Metallons*. Londres. Reino Unido: Ed. Taylor and Francis; 1997.
- [19] Fergusson JE. *The heavy elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Londres. Reino Unido: Ed Pergamon Press; 1990.
- [20] Spiro TG, Stigliani WM. *Chemistry of the Environmental*. Nueva Jersey, Estados Unidos: Ed. Prentice Hall; 1996.
- [21] Reeve RN. *Environmental Analysis*. Chichester, Reino Unido: Ed. John Willey and Sons; 1994.
- [22] Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Eng.* 1986; 25:1058–107.
- [23] López-Barea J. Biomarkers in ecotoxicology: an overview. *Arch Toxicol Suppl.* 1995; 17:57- 79.
- [24] Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullas M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006; 64(2):178–89.
- [25] Maret W, Copsey M. Metallomics: whence and whither. *Metallomics.* 2012; 4:1017-1019.
- [26] Wolfe-Simon F, Switzer Blum, J, Kulp TR, Gordon GW, Hoefft SE, Pett-Ridge J, et al. A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. *Science.* 2010; 332:1163-1116.
- [27] Edmonds JS, Francesconi KA. Transformation of arsenic in the marine environment. *Experientia.* 1987; 43:553-557.

- [28] Johri N, Jacquillet G, Unwin R. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *BioMetals*. 2010; 162:167-173.
- [29] Gonick HC. Lead-Binding Proteins: A Review. *J Toxicol*. 2011; 2011.
- [30] Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol*. 2006; 36:609- 662.
- [31] Escanero JF. Aspectos Bioquímicos, Analíticos y Clínicos. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 1998.
- [32] Lippard SJ, Berg JM. Principles of Bioinorganic Chemistry. California: Mill Valley; 1994.
- [33] Iyengar GV. Element Analysis of Biological Systems. Volumen I, Florida, Estados Unidos: Ed. CRC Press. Boca Ratón; 1989.
- [34] Laporte, JR, Tognoni G. Principios de epidemiología del medicamento. Capítulo 1. 2ª edición. Editorial: Masson.
- [35] Heberer T. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J Hydrol*. 2002; 266(3-4):175-189.
- [36] Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC, Jørgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review. *Chemosphere*. 1998; 36(2):357-393.
- [37] Andreozzi R, Raffaele M, Nicklas P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*. 2003; 50:1319– 1330.
- [38] Carballa M, Omil F, Lema JM, Llombart M, García-Jares C, Rodríguez I, Gómez M, et al. Behaviour of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res*. 2004; 38:2918–2926.
- [39] Caliman FA, Gavrilescu M. Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment - A Review. *Clean - Soil, Air, Water*. 2009; 37(4-5):277-303.
- [40] Daughton CA, Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. *Environ Health Persp*. 1999; 107:1–41.

INTRODUCCIÓN

- [41] Ternes T, Hirsch R, Mueller J, Haberer K. Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and alpha2-sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS, Fresen. J Anal Chem. 1998; 362:329–340.
- [42] Ternes T. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Res. 1998; 32 (11):3245-3260.
- [43] Ellis J. Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. Environ Pollut. 2006; 144(1):184-189.
- [44] Baquero F, Martínez J, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Curr Opin Chem Biol. 2008; 19(3):260-265.
- [45] Fent K, Weston A, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Toxicol. 2006; 76(2):122–59.
- [46] ASHP Therapeutic Position Statement on the Safe Use of Oral Nonprescription Analgesics. Am J Health Syst Pharm. 1999; 56(11):1126-1131.
- [47] Gan TJ. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. Curr Med Res Opin. 2010; 26:1715–1731.
- [48] Landsdorp D, Vree TB, Janssen TJ, Guelen PJM. Pharmacokinetics of rectal diclofenac and its hydroxy metabolites in man. Int J Clin Pharmacol Ther and Toxicol. 1990; 28:298–302.
- [49] Burkhard-Holm P. Endocrine disruptors and water quality: a state-of-the-art review. Int. J. Water Res. Develop. 2010; 2(3):477-493.
- [50] Purdom C, Hardiman P, Bye V, Eno N, Tyler C, Sumpter J. Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. Chem Ecol. 1994; 8:275–285.
- [51] Chesman BS, Langston WJ. Intersex in the clam *Scrobicularia plana*: a sign of endocrine disruption in estuaries? Biol Lett. 2006; 2(3):420–422.
- [52] Liang LN, He B, Jiang GB, Chen DY, Yao ZW. Evaluation of mollusk as biomonitors to investigate heavy metal contamination along the Chinese Bohai Sea. Sci Total Environ. 2004; 324:105–113.
- [53] Bebianno MJ, Serafim MA. Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussates*. Arch Environ Contam Toxicol. 2003; 44(1):53–66.

- [54] Qadir A, Malik RN, Husain SZ. Spatio-temporal variations in water quality of Nullah Aik-tributary of the river Chenab, Pakistan. *Environ Monit Assess.* 2008; 140:43–59.
- [55] Qadir A, Malik RN. Assessment of an index of biological integrity (IBI) to quantify the quality of two tributaries of river Chenab, Sialkot, Pakistan. *Hydrobiology.* 2009; 621:127–153.
- [56] Burger J, Gochfeld M, Sullivan K, Irons D. Mercury, arsenic, cadmium, chromium, lead, and selenium in feathers of pigeon guillemots (*Cepphus columba*) from Prince William Sound and the Aleutian Islands of Alaska. *Sci. Total Environ.* 2007; 387:175–184.
- [57] García-Sevillano M.a., González-Fernández M, Jara-Biedma R, García-Barrera T, López-Barea J, et al. Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2012; 404(6-7):1967–81.
- [58] Hernández M, González LM, Oria J, Sánchez R, Arroyo B. (.)Influence of contamination by organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls on the breeding of the spanish imperial eagle (*Aquila Adalberti*). *Environ Toxicol Chem.* 2008; 27:433–441.
- [59] Walker CH. The Use of Biomarkers to Measure the Interactive Effects of Chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1998; 40:65-70.
- [60] Mumtaz MM, Tully DB, El-Masri HA, De Rosa CT. Gene induction studies and toxicity of chemical mixtures. *Environ Health Perspect.* 2002; 110:947-956.
- [61] García-Sevillano Ma., Abril N, Fernández-Cisnal R, García-Barrera T, Pueyo C, López-Barea, et al. Functional genomics and metabolomics reveal the toxicological effects of cadmium in *Mus musculus* mice. *Metabolomics.* 2015; 1432–1450.
- [62] Fossi MC. Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environ Health Perspect.* 1994; 102:49–54.
- [63] Snape JR, Maund SJ, Pickford DB, Hutchinson TH. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 2004; 67: 143-154.
- [64] Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 1999; 17:121-127.

INTRODUCCIÓN

- [65] Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 1998; 19:1853-1861.
- [66] Gygi SP, Aebersold R. Mass spectrometry and proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. 2000; 4:489-494.
- [67] Singh OV, Nagaraj NS. Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2006; 4: 355–362.
- [68] Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol*. 2000; 18:1157-1161.
- [69] Gago-Tinoco A, González-Domínguez R, García-Barrera T, Blasco-Moreno J, Bebianno MJ, Gómez-Ariza JL. Metabolic signatures associated with environmental pollution by metals in Doñana National Park using *P. clarkii* as bioindicator. *Environ Sci Pollut Res*. 2014; 21(23):13315-23.
- [70] Wu RQ, Zhao XF, Wang ZY, Zhou M, Chen QM. Novel Molecular Events in Oral Carcinogenesis via Integrative Approaches. *J Dent Res*. 2011; 90:561-572.
- [71] Rensing C, Ghosh M, Rosen BP. Families of Soft-Metal-Ion-Transporting ATPases. *J. Bacteriol*. 1999; 181:5891-5897.
- [72] Spuznar J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst*. 2005; 130:442-465.
- [73] Lobinski R, Sabine Becker J, Haraguchi H, Sarkar B. () Metallomics: guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*. 2010; 82(2):493-504.
- [74] Tainer, J.A., Roberts, V.A., Getzoff, E.D. Metal-binding sites in proteins. *Curr Opin Biotechnol*. 1991; 2:582.
- [75] Coleman JE. Zinc enzymes. *Curr Opin Chem Biol*. 1998; 2:222-234.
- [76] Berg JM, Shi Y. The Galvanization of Biology: A Growing Appreciation for the Roles of Zinc. *Science*. 1996; 271:1081-1085.
- [77] Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *J Embo*. 1995; 14:639-649.

- [78] Outten CE, O'Halloran TV. Femtomolar Sensitivity of Metalloregulatory Proteins Controlling Zinc Homeostasis. *Science*. 2001; 292:2488-2493.
- [79] Maret W. Exploring the zinc proteome. *J Anal At Spectrom*. 2004; 19:15-19.
- [80] Rosen BP. Metals in biology: past, present, and future. *Top Curr Genet*. 2006; 14:485–505.
- [81] Rosenzweig AC. Metallochaperones: Bind and Deliver. *Chem Biol*. 2002; 9:673-677.
- [82] Monicou S, Szpunar J, Lobinski R. Metallomics: the concept and methodology. *Chem Soc Rev*. 2009; 38:1119-138.
- [83] Haraguchi H. Metallomics as integrated biometal science. *J Anal At Spectrom*. 2004; 19, 5–14.
- [84] Williams RJP. Chemical selection of elements by cells. *Coord Chem Rev*. 2001; 216 583.
- [85] Lobinski R, Sabine Becker J, Haraguchi H, Sarkar B. Metallomics: guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*. 2010; 82:493.
- [86] Szpunar J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem*. 2004; 378:54.
- [87] Koppelaar DW, Hieftje GM. Metallomics - An Interdisciplinary and Evolving Field. *J Anal At Spectrom*. 2007; 22:855.
- [88] López Barea J, Gómez Ariza JL. Environmental proteomics an metallomics. *Proteomics*. 2006; 6:S51-S62.
- [89] Shi W, Chance MR. Metallomics and metalloproteomics. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65:3040-3048.
- [90] Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol*. 2000; 18:1157-1161.
- [91] Ge R, Sun X, He QY. Overview of the metallometabolomic methodology for metal-based drug metabolism. *Curr Drug Metab*. 2011; 12:287-99.
- [92] Timerbaev AR. Determination of Metal Species in Biological Samples: From Speciation Analysis to Metallomics. *J. Anal. Chem*. 2012; 67:179–185.

INTRODUCCIÓN

- [93] Templeton DM, Ariese F, Cornelis R, Lars-Göran D, Muntau H, Van Leewen HP, et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure Appl Chem*. 2000; 72:1453-1470.
- [94] Szpunar J. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst*. 2000; 125:963-988.
- [95] Sanz-Medel A. Trace element analytical speciation in biological systems: Importance, challenges and trends. *Spectrochim Acta B*. 1998; 53:197-211.
- [96] Cabrera F, Tocca CG, Doaz E, Arambarri P. Acid mine-water and agricultural pollution in a river skirting the Doñana National Park (Guadiamar river, SW Spain). *Water Res*. 1984; 18:1469-1482.
- [97] Albaiges J, Algaba J, Arambarri P, Cabrera F, Baluja G, Hernandez LM, Castroviejo J. Budget of organic and inorganic pollutants in the Doñana National Park (Spain). *Sci Total Environ*. 1987; 63:13-28.
- [98] Arambarri P, Cabrera F, González-Quesada R. Quality of the surface waters entering the Doñana National Park (SW Spain). *Sci Total Environ*. 1996; 191:185-196.
- [99] Boski T, Moura DM, Machado L, Bebianno MJ. Trace metals on the Algarve coast, I: Associations, origins and remobilisation of natural components (Conference Paper). *Boletín - Instituto Español de Oceanografía*. 1999; 15(1-4):457-463.
- [100] Stenner RD, Nickless G. Heavy metals in organisms of the Atlantic coast of S.W. Spain and Portugal. *Mar Pollut Bull*. 1975; 6(6):89-92.
- [101] Murillo JM, Marañón T, Cabrera F, López R. Accumulation of heavy metals in sunflower and sorghum plants affected by the Guadiamar spill. *Sci Total Environ*. 1999; 242:281-292.
- [102] Simon M, Ortiz I, García I, Fernández E, Fernández J, Dorronsoro C, Aguilar J. Pollution of soils by the toxic spill of a pyrite mine Aznalcollar, Spain. *Sci Total Environ*. 1999; 242:105-115.
- [103] Sánchez-López FJ, Gil-García MD, Martínez-Vidal JL, Aguilera PA, Garrido-Frenich A. Assessment of metal contamination in Doñana National Park (Spain) using crayfish (*Procambarus Clarkii*). *Environ Monit Assesst*. 2004; 93:17-29.

- [104] Madejón P, Murillo JM, Marañón T, Cabrera F, López R. Bioaccumulation of As, Cd, Cu, Fe and Pb in wild grasses affected by the Aznalcollar mine spill (SW Spain). *Sci Total Environ.* 2002; 290:105–120.
- [105] Madejón P, Murillo JM, Marañón T, Cabrera F, Soriano MA. Trace element and nutrient accumulation in sunflower plants two years after the Aznalcollar mine spill. *Sci Total Environ.* 2003; 307:239–257.
- [106] Taggart MA, Figuerola J, Green AJ, Mateo R, Deacon C, Osborn D., et al. After the Aznalcollar mine spill: Arsenic, zinc, selenium, lead and copper levels in the livers and bones of five waterfowl species. *Environ Res.* 2006; 100:349–361.
- [107] Manzano M, Ayora C, Domenech C, Navarrete P, Garralon A, Turrero MJ. The impact of the Aznalcollar mine tailing spill on Groundwater. *Sci Total Environ.* 1999; 242:189-209.
- [108] Martin JE, Respaldiza MA, González-Labajo J. The state of the Guadiamar riverbed after the environmental disaster of 1998 analysed by TTPIXE. *Nucl Instrum Methods B.* 2002; 188:102–105.
- [109] Verpoorte R, Choi YH, Mustafa NR, Kim HK. Metabolomics: back to basics. *Phytochem Rev.* 2008; 7:525–537.
- [110] Issaq HJ, Abbott E, Veenstra TD. Utility of separation science in metabolomic studies. *J Sep Sci.* 2008; 31:1936–1947.
- [111] Ankley GT, Dalston GP, Degitz SJ, Denslow ND, Hoke RA, Kennedy SW, et al. Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology. *Environ Sci Technol.* 2006; 40:4055–4065.
- [112] Van Ravenzwaay B, Cunha GCP, Leibold E, Looser R, Mellert W, Prokoudine A, et al. The use of metabolomics for the discovery of new biomarkers of effect. *Toxicol Lett.* 2007; 172:21–28.
- [113] Van Ravenzwaay B, Herold M, Kamp H, Kapp MD, Fabian E, Looser R, et al. Metabolomics: a tool for early detection of toxicological effects and an opportunity for biology based grouping of chemicals—from QSAR to QBAR. *Res. Genet Toxicol Environ Mutat.* 2012; 746, 144–150.
- [114] Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev.* 2011; 40:387-426.

INTRODUCCIÓN

- [115] Beecher CWW. The Human Metabolome, En: Harrigan GG, Goodacre R (Eds.), Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis, New York: Springer; 2003.
- [116] Sanderson H, Thomsen M. Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system for chemicals. Assessment of the (Q)SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicit. Toxicology Letters, 2009; 187(2):84–93.
- [117] Sanderson H, Thomsen M. Ecotoxicological quantitative structure-activity relationships for pharmaceuticals. Bull Environ Contamin Toxicol. 2007; 79(3):331–5.
- [118] Bundy JG, Davey MP, Viant MR. Environmental metabolomics : a critical review and future perspectives, Metabolomics. 2009; 5:3–21.
- [119] González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. (2012) Metabolomic approach to Alzheimer's disease diagnosis based on mass spectrometry. Chem Pap. 66(9), 829–835.
- [120] Morrison N, Bearden D, Bundy JG, Collette T, Currie F, Davey MP et al. Standard Reporting Requirements for Biological Samples in Metabolomics Experiments: Environmental Context. Metabolomics. 2007; 3 (3): 203–210.
- [121] García-Sevillano MA, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Environmental metabolomics : biological markers for metal toxicity. Electrophoresis. 2015; 36 (18):1–36.
- [122] Goldsmith P, Fenton H, Morris-Stiff G, Ahmad N, Fisher J, Prasad KR. Metabonomics: a useful tool for future surgeon. J Surg Res. 2010; 160:122–132.
- [123] Pennings SC, Bertness MD. Salt Marsh Communities. En: Marine Community Ecology. Bertness MD, Gaines SD, Hay M (Ed). Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts; 2001.
- [124] Rodríguez ET, Pardo AM. The crab *Carcinus maena* as a suitable experimental model in ecotoxicology. Environ Int. 2014; 70:158-182.
- [125] Byrne PA, Halloran JO. The role of bivalve molluscs as tools in estuarine sediment toxicity testing : a review. Hydrobiologia. 2001; 465: 209–217.

- [126] Pérez-Mayol S, Blasco J, Tornero V, Morales-Nin B, Massanet A, Tovar Sánchez A. Are the shells of *Scrobicularia plana* useful for monitoring trace metal pollution events?. J Environ Biol. 2014; 35:9–17.
- [127] García-Luque E, DelValls AT, Forja JM, Gómez-Parra A. Biological adverse effects on bivalves associated with trace metals under estuarine environments. Environ Monit Assess. 2007; 131(1-3):27–35.
- [128] García-Luque E, DelValls Ta, Casado-Martínez C, Forja JM, Gómez-Parra A. Simulating a heavy metal spill under estuarine conditions: effects on the clam *Scrobicularia plana*. Mar Environ Res. 2004; 58(2-5):671–674.
- [129] Bebianno MJ. Effects of pollutants in the Ria Formosa Lagoon, Portugal. Sci Total Environ. 1995; 171:107-115.
- [130] Roméo M, Gnassia-Barelli M. Effect of Heavy Metals on Lipid Peroxidation in the Mediterranean Clam *Ruditapes decussates*. Comp Biochem Phys Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 1997; 118(1): 33-37.
- [131] Jensen AC, Humphreys J, Caldow RWG, Grisley C, Dyrinda PEJ. Naturalization of the Manila clam (*Tapes philippinarum*), an alien species, and establishment of a clam fishery within Poole Harbour, Dorset. J Mar Biol Assoc UK. 2004; 84:1069–1073.
- [132] FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 1996; 82:399–400.
- [133] Usero J, González-Regalado E, Garcia I. Trace metals in the bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic coast of southern Spain. Environ Int. 1997; 23:291–298.
- [134] Hamza-Chaffai A, Amiard JC, Cosson RP. Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of the clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a non-linear model using Box-Cox transformation. Comp Biochem Phys C. 1999; 123:153–163.
- [135] Donaghy L, Lambert C, Choi KS, Soudant P. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects. Aquaculture. 2009; 297:10–24.

INTRODUCCIÓN

- [136] Gosling E. Bivalve mollusks. Oxford: Fishing News Books; 2003.
- [137] Beiras R, Albentosa M. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Venerupis decussata* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals: implications for the implementation of seawater quality criteria. *Aquaculture*. 2004; 230:205-213.
- [138] Toba M, Kosemura T, Yamakawa H, Sugiura Y, Kobayashi Y. Field and laboratory observations on the hypoxic impact on survival and distribution of short-necked clam *Ruditapes philippinarum* larvae in Tokyo Bay, central Japan. *Plank Benth Res*. 2008; 3:165-173
- [139] Casado-Martínez MC, Blasco J, González-Castromil MA, Riba I, Del Valls TA. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. V. Whole sediment toxicity test using juveniles of the bivalve *Ruditapes philippinarum*. *Mar Sci*. 2006; 32:159-166.
- [140] Munari M, Matozzo V, Marin MG. Combined effects of temperature and salinity on functional responses of haemocytes and survival in air of the clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish Shellfish Immun*. 2011; 30:1024-1030.
- [141] Harley CDG, Randall Hughes A, Hultgren KM, Miner BG, Sorte CJB, Thornber CS, et al. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecol Lett*. 2006; 9:228–24.
- [142] Aguirre-Martínez GV, Buratti S, Fabbri E, DelValls AT, Martín-Díaz ML. Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. *J Environ Sci*. 2013; 25(7):1408–1418.
- [143] Cruz MJ, Rebelo R. Colonization of freshwater habitats by an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*, in Southwest Iberian Peninsula. *Hydrobiologia*. 2006; 575(1):191–201.
- [144] Vioque-Fernández A, Alves de Almeida E, López-Barea J. Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Sci Total Environ*. 2009; 407(5):1784–1797.
- [145] Rueda J, Camacho A, Mezquita F, Hernández R, Roca JR. Effect of episodic and regular sewage discharges on the water chemistry and macroinvertebrate fauna of a Mediterranean stream. *Water, Air and Soil Pollution*. 2002; 140:425-444.
- [146] Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a

practical approach. *Sci Tot Environ*. Special issue on Towards an integrative approach in Environmental Contamination and Toxicology. 2000; 247: 295-311.

[147] Garrigues P, Barth H, Walker CH, Narbonne JF. *Biomarkers in Marine Organisms; A Practical Approach*. Elsevier Science B.V; 2001.

[148] Peakall D. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol Ecotoxicol News*. 1994; 1, 55-60.

[149] Livingstone DR. *Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment*. *J Chem Tech Biotechnol*. 1993; 57:195-211.

[150] Timbrell, J. *Principles of Biochemical Toxicology*. London:Taylor & Francis; 2001.

[151] Timbrell JA, Draper R, Waterfield CJ. Biomarkers in Toxicology. New uses for some old molecules. *Toxicol Ecotoxicol News*. 1994; 1:4-14.

[152] Sorensen M, Autrup H, Moller P, Hertel O, Jensen SS, Vinzents P, et al. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res*. 2003; 544:255-271.

[153] Timbrell JA. Biomarkers in toxicology. *Toxicology*. 1998; 129:1-12.

[154] Grandjean P, Brown SS, Reavey P, Young DS. Biomarkers of chemical exposure: state of the art. *Clin Chem*. 1994; 40:1360-1362.

[155] Okey AB. Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmacol Ther*. 1990; 45:241- 298.

[156] Escartín E, Porte C. Bioaccumulation, metabolism and biochemical effects of the organophosphorus pesticide fenitrothion in *Procambarus clarkii*. *Environ Toxicol Chem*. 1996; 15:915-920.

[157] Solé M, Kopecka-Pilarczyk J, Blasco J. Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh ecosystem in SW Spain. *Environ Internat*. 2009; 35(3):523–31.

[158] Sheehan D, Power A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defencemechanisms of bivalve molluscs. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1999; 123:193-199.

INTRODUCCIÓN

- [159] Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2003; 13:57-149.
- [160] Donato MT. Monografía XIV. Citocromo P-450. ¿Qué es y cómo funciona? Real Academia de Farmacia. p. 36; 2004.
- [161] Goksoyr A. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol Suppl.* 1995; 17:80-95.
- [162] Hodgson E. *A Textbook of Modern Toxicology.* Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2004.
- [163] Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995; 30:445-600.
- [164] Hahn ME. The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comp. Biochem. Physiol C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 1998; 121:23-53.
- [165] Frova, C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 2006; 23:149-169.
- [166] Ouaisi A, Ouaisi M, Sereno D. Glutathione S transferases and related proteins from pathogenic human parasites behave as immunomodulatory factors. *Immunol Lett.* 2002; 81:159-164.
- [167] Ketterer, B. A bird's eye view of the glutathione transferase field. *Chem. Biol. Interact.* 2001; 138:27-42.
- [168] Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 2001; 360:1-16.
- [169] Ranganathan S, Ciaccio PJ, Tew KD. Principles of drug modulation applied to glutathione-S-transferases. En: Tew KD, P.C., Mantle Tj, Mannervik B, Hayes JD (Ed.), *Structure and Function of Glutathione Transferases.* Boca Raton, CRC Press, 249-256; 1993.
- [170] Kruk I. *Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species.* Berlin, Springer-Verlag; 1998.

- [171] Winston GW, Di giulio RT. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicol.* 1991; 19:137-161.
- [172] Sies, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int.* 1986; 25:1058-1107.
- [173] Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30:620-650.
- [174] Rodríguez-Ariza A, Alhama J, Diaz-Mendez FM, Lopez-Barea J. Content of 8-oxod G in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutat Res.* 1999; 438:97-107.
- [175] Brown RK, Kelly FJ. Peroxides and others products. *Free Radicals: a Practical Approach.* Punchard NA, Kelly FJ (Ed.). p. 119-13. Oxford: IRL Press; 1996.
- [176] Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci.* 1990; 15:129-135.
- [177] Pedrajas JR, Gavilanes F, López-Barea J, Peinado J. Incubation of superoxide dismutase with malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal forms new active isoforms and adducts. An evaluation of xenobiotics in fish. *Chem Biol Interact.* 1998; 116:1-17.
- [178] González-Fernández M, García-Sevillano MA, Jara-Biedma R, García-Barrera, T, Vioque, A., López-Barea J, et al. Size characterization of metal species in liver and brain from free-living (*Mus spretus*) and laboratory (*Mus Musculus*) mice by SEC-ICP-MS: Application to environmental contamination assessment. *J Anal At Spectrom.* 2011; 26:141-149.
- [179] González-Fernandez M, García-Sevillano MA, Jara-Biedma R, Navarro-Roldán F, García-Barrera T, López-Barea J, et al. Use of Metallomics in Environmental Pollution Assessment Using Mice *Mus musculus/Mus spretus* as Bioindicators *Curr Anal Chem.* 2013; 9:229-243.
- [180] García-Sevillano MA, Jara-Biedma R, González-Fernández M, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Metal interactions in mice under environmental stress. *Biometals.* 2013; 26:651–666.
- [181] Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension.* 2004; 44:381-386.

INTRODUCCIÓN

[182] Nordberg J, Arnér ES () Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31:1287-312.

[183] Solé M, Porte C, Albaigés J. Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ Toxicol Chem.* 1995; 14:157- 164.

[184] Messersschmidt A, Huber R, Wieghardt K, Poulos T. () *Handbook of Metalloproteins*. Wiley; 2001.

[185] López-Barea J. Molecular biomarkers of oxidative stress and environmental pollution. *Rev Toxicol.* 2000; 17(1):12-18.

[186] Langston WJ, Bebianno MJ, Burt GR. Metal handling strategies in molluscs. En: Langston, WJ, Bebianno MJ. (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. London: Chapman and Hall. 1998; p. 219–283.

[187] Viarengo A, Burlando B, Dondero F, Marro A, Fabbri R. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Bio- markers.* 1999; 4: 455-466.

[188] Goenaga H, Infante Campenhout K, Van, Blust R, Adams FC. Anion-exchange high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma isotope dilution-time-of-flight mass spectrometry for speciation analysis of metal complexes with metallothionein isoforms in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) exposed to environmental metal pollution. *J Chromatogr A.* 2006; 1121:184–190.

[189] Tahán JE, Sánchez JM, Granadillo VA, Cubillán HS, Romero RA. Concentration of Total Al, Cr, Cu, Fe, Hg, Na, Pb, and Zn in Commercial Canned Seafood Determined by Atomic Spectrometric Means after Mineralization by Microwave Heating. *J Agr Food Chem.* 1995; 43:910-915.

[190] Lord DA, McLaren JW, Wheeler RC. Determination of Trace Metals in Fresh Mussels by Atomic Absorption Spectrometry with Direct Solid Sample Injection. *Anal Chem.* 1977; 49, 257-261.

[191] Polec K, García-Arribas O, Pérez-Calvo M, Szpunar J, Ribas-Ozonas B, Lobinski R. Identification of cadmium-bioinduced ligands in rat liver using parallel HPLC-ICP-MS and HPLC-electrospray MS. *J Anal At Spectrom.* 2000; 15:1363-1368.

- [192] Polec K, Pérez-Calvo M, García-Arribas O, Szpunar J, Ribas-Ozonas, B. Lobinski R. () Investigation of metal complexes with metallothionein in rat tissues by hyphenated techniques. *J Inorg Biochem.* 2002; 88:197-206.
- [193] Scout TA, Mercer EI. *Concise Encyclopedia Biochemistry and Molecular Biology.* 3ra edición. Berlín, Alemania: Ed. W de G; 1997.
- [194] Vioque-Fernández A, de Almeida EA, Ballesteros J, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL, López-Barea J. Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicol Lett.* 2007; 168(3):260–8.
- [195] Dauvin JC. Effects of heavy metal contamination on the macrobenthic fauna in estuaries: the case of the Seine estuary. *Mar Poll Bulletin.* 2008; 57(1-5):160–9.
- [196] Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicol.* 2006; 76(2):160–202.
- [197] Ribeiro J, Monteiro C, Monteiro P, Bentes L, Coelho R, Gonzalves JMS, Linoi PG, Erzini K. Long-term changes in fish communities of the Ria Formosa coastal lagoon (southern Portugal) based on two studies made 20 years apart. *Est Coast Shelf Sci.* 2008; 76:270-278.
- [198] Padinha C, Santos R, Brown MT. Evaluating environmental contamination in Ria Formosa (Portugal) using stress indexes of *Spartina maritime*. *Mar Environ Res.* 2000; 49(1):67–78.
- [199] Palanques A, Diaz J, Farran M. Contamination of heavy metals in suspended and surface sediment of the Gulf of Cadiz (Spain): the role of sources, currents pathways and sinks. *Oceanol Acta.* 1995; 18:469-477.
- [200] Stecko JRP, Bendell-Young LI. Contrasting the geochemistry of suspended particulate matter and deposited sediments within an estuary. *Appl Geochem.* 2000; 15:753-775.
- [201] Delgado J, Boski T, Nieto JM, Pereira L, Moura D, Gomes A, et al. Sea-level rise and anthropogenic activities recorded in the late Pleistocene/Holocene sedimentary infill of the Gadiana Estuary (SW Iberia). *Quat Sci Rev.* 2012; 33:121-141.
- [202] Riba I, DeValls TA, Forja JM, Gómez-Parra A. Influence of the Aznalcóllar mining spill on the vertical distribution of heavy metals in sediments from the Guadalquivir estuary (SW Spain). *Mar Pollut Bull.* 2002; 44:39–47.

INTRODUCCIÓN

[203] Sáenz V, Blasco J, Gomez-Parra A. Speciation of heavy metals in recent sediments of three coastal ecosystems in the gulf of Cádiz, Southwest Iberian Peninsula. *Environ Toxicol Chem.* 2003; 22(12):2833–2839.

[204] Madejón P, Murillo JM, Marañón T, Cabrera F, Soriano MA. Trace element and nutrient accumulation in sunflower plants two years after the Aznalcollar mine spill. *Sci Total Environ.* 2003; 307:239–257.

[205] Taggart MA, Figuerola J, Green AJ, Mateo R, Deacon C, Osborn D, et al. After the Aznalcollar mine spill: Arsenic, zinc, selenium, lead and copper levels in the livers and bones of five waterfowl species. *Environ Res.* 2006; 100:349–361.

[206] Bonilla-Valverde D, Ruiz-Laguna J, Muñoz A, Ballesteros J, Lorenzo F, Gómez-Ariza JL, López-Barea J. Evolution of biological effects of Aznalcóllar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers *Toxicology* 2004; 197:123–138.

[207] Grimalt JO, Ferrer M, MacPherson E. Special issue: the mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci. Total Environ.* 1999; 242:3–11.

[208] Consejería de Medio Ambiente. Programa de Investigación del Corredor Verde del Guadiamar PICOVER 1999-2002. Consejería de Medio Ambiente, 192; 2000.

[209] Gallart F, Benito G, Martín-Vide JP, Benito A, Prió JM. Fluvial geomorphology and hydrology in the dispersal and fate of pyrite mud particles released by the Aznalcóllar e tailings spill. *Sci Total Environ.* 1999; 242:13-26.

[210] Garralon A, Gomez P, Turrero MJ, Sánchez M, Melón AM. The geochemical aspects of toxic waters retained in the Entremuros area (Spain). *Sci Tot Environ.* 1999; 242:27-40.

[211] Macklin MG, Hudson-Edwards KA, Jamieson HE, Brewer P, Coulthard TJ, Howard AJ, Renenda VH. Physical stability and rehabilitation of sustainable aquatic and riparian ecosystems in the Río Guadiamar, Spain, following the Aznalcóllar mine tailings dam failure. *Mine, Water and Environment. International Mine Water Association Congress, Seville, Spain.* 1999; 271-278

[212] Hudson-Edwards KA, Macklin MG, Jamieson HE, Brewer PA, Coulthard TJ, Howard AJ, et al. The impact of tailings dam spills and clean-up on sediment and water quality in river systems: the Ríos Agrio-Guadiamar, Aznalcóllar, Spain. *Applied Geochemistry.* 2003; 18:221–239.

- [213] Consejería de Medio Ambiente. Programa de Investigación del Corredor Verde del Guadiana PICOVER 1999-2002. Consejería de Medio Ambiente, 192; 2000.
- [214] Oñate JJ, Pereira D, Suarez F. Strategic Environmental Assessment of the Effects of European Union's Regional Development Plans in Doñana National Park (Spain). *Environ Manage.* 2003; 31:642-655.
- [215] Gómez Ariza JL, García-Barrera T, Lorenzo F, Arias A. Analytical characterization of bioactive metal species in the cellular domain (metallomics) to simplify environmental and biological proteomics. *Intern J Environ Anal Chem.* 2005; 85:255-266.
- [216] Szpunar J, Lobinski R. Multidimensional approaches in biochemical speciation analysis. *Anal Bional Chem.* 2002; 373:404-411.
- [217] Jara-Biedma R, González-Dominguez R, García-Barrera T, López-Barea J, Pueyo C, Gómez-Ariza JL. Evolution of metallothionein isoforms complexes in hepatic cells of *Mus musculus* along cadmium exposure. *Biometals.* 2013; 26:639–650.
- [218] Arnaudguilhem C, Bierla K, Ouerdane L, Preud'homme H, Yiannikouris A, Lobinski R. Selenium metabolomics in yeast using complementary reversed-phase/hydrophilic ion interaction (HILIC) liquid chromatography–electrospray hybrid quadrupole trap/Orbitrap mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2013; 757:26–38.
- [219] Gomez-Ariza JL, Garcia-Barrera T, Lorenzo F, Bernal V, Villegas MJ, Oliveira V. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. *Anal Chim Acta.* 2004; 524:15–22.
- [220] Szpunar J, Bouyssiere B, Lobinski R. Sample preparation for speciation analysis for metallobiomolecules. En: Mester Z, Sturgeon R (Ed.). *Sample Preparation for Trace Element Analysis.* Amsterdam: Elsevier. 2003; 1185–1210.
- [221] Taylor HE. *Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry. Practices and Techniques;* 2001.
- [222] Thomas R. *Practical Guide to ICP-MS;* 2004.
- [223] Schaumlöffel D, Ruiz Encinar J, Lobinski R. Development of a Sheathless Interface between Reversed-Phase Capillary HPLC and ICPMS via a Microflow Total Consumption Nebulizer for Selenopeptide Mapping. *Anal Chem.* 2003; 75:6837-6842.

INTRODUCCIÓN

[224] Giusti P, Lobinski R, Szpunar J, Schaumlöffel D. Development of a Nebulizer for a Sheathless Interfacing of NanoHPLC and ICPMS. *Anal Chem.* 2006; 78:965-967.

[225] Gilar M, Olivova P, Daly AE, Gebler JC. Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 2005; 77:6426-6434.

[226] Casiot C, Vacchina V, Chassaigne H, Szpunar J, Potin-Gautier M, Lobinski R. An approach to the identification of selenium species in yeast extracts using pneumatically-assisted electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Commun.* 1999; 36:77-80.

[227] Szpunar J. () Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst.* 2005; 130:442-465.

[228] Cela R, Lorenzo RA, Casais MC. *Técnicas de separación en Química Analítica*; 2002.

[229] Del Castillo Busto ME, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A. Accurate Determination of Human Serum Transferrin Isoforms: Exploring Metal-Specific Isotope Dilution Analysis as a Quantitative Proteomic Tool. *Anal Chem.* 2006; 78:8218-8226.

[230] Ouerdane L, Mari S, Czernic P, Lebrun M, Lobinski R. Speciation of noncovalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after their isolation by 2D size exclusion-hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS. *J Anal At Spectrom.* 2006; 21:676-683.

[231] Ellis DI, Goodacre R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst.* 2006; 131:875-885.

[232] Fancy SA, Beckonert O, Darbon G, Yabsley W, Walley R, Baker D, Perkins GL, Pullen FS, Rumpel K. Gas chromatography/flame ionisation detection mass spectrometry for the detection of endogenous urine metabolites for metabolomic studies and its use as a complementary tool to nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006; 20:2271-2280.

[233] Pan Z, Raftery D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Anal Bioanal. Chem.* 2007; 387:525-527.

[234] Dettmer K, Aronov AP, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev.* 2007; 26:51-78.

- [235] Broadhurst DI, Kell DB. (2006) Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics*. 2, 171-196.
- [236] Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2012; 403:1523-1548.
- [237] Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J Proteomics*. 2012; 75:1079-1088.
- [238] Xiayan L, Legido-Quigley C. Advances in separation science applied to metabonomics. *Electrophoresis*. 2008; 29:3724-3736.
- [239] Kuehnbaum NL, Britz-McKibbin P. New advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. *Chem Rev*. 2013; 113:2437-2468.
- [240] Wilson ID, Nicholson JK, Castro-Perez J, Granger JH, Johnson KA, Smith BW, Plumb RS. High resolution "ultra performance" liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *J Proteome Res*. 2005; 4:591-598.
- [241] Barbas C, Moraes EP, Villaseñor A. Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targeted fingerprinting of biological samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2011; 55:823-831.
- [242] Draper J, Lloyd AJ, Goodacre R, Beckmann M. Flow infusion electrospray ionisation mass spectrometry for high throughput, non-targeted metabolite fingerprinting: a review. *Metabolomics*. 2013; 9, S4-S29.
- [243] Huang MZ, Cheng SC, Cho YT, Shiea J. Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial. *Anal Chim Acta* 2011; 702:1-15.
- [244] Cai SS, Syage JA. Comparison of atmospheric pressure photoionization, atmospheric pressure chemical ionization, and electrospray ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Anal Chem*. 2006; 78:1191-1199.
- [245] An Z, Chen Y, Zhang R, Song Y, Sun J, He J, et al. Integrated ionization approach for RRLC-MS/MS-based metabonomics: finding potential biomarkers for lung cancer. *J Proteome Res*. 2010; 9:4071-4081.

INTRODUCCIÓN

[246] Tian H, Bai J, An Z, Chen Y, Zhang R, He J, et al. Plasma metabolome analysis by integrated ionization rapid resolution liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2013; 27:2071-2080.

[247] Want EJ, Nordström A, Morita H, Siuzdak G. From exogenous to endogenous: the inevitable imprint of mass spectrometry in metabolomics. *J Proteome Res.* 2007; 6:459-468.

[248] Weaver PJ, Laures AMF, Wolff JC. Investigation of the advanced functionalities of a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007; 21:2415-2421.

[249] Katajamaa M, Oresic M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J Chromatogr A.* 2007; 1158:318-328.

[250] Van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, Van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC. Genomics.* 2006; 7: 142.

[251] Hrydziuszko O, Viant MR. Missing values in mass spectrometry based metabolomics: an undervalued step in the data processing pipeline. *Metabolomics.* 2012; 8:S161-S174.

[252] Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res.* 2007; 6:469-479.

[253] Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics.* 2013; 9:280-299.

[254] Pulfer M, Murphy RC. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev.* 2003; 22:332-364.

[255] Liebisch G, Binder M, Schifferer R, Langmann T, Schulz B, Schmitz G. High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1761:121-128.

[256] Murphy RC, Leiker TJ, Barkley RM. Glycerolipid and cholesterol ester analyses in biological samples by mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1811:776-783.

[257] Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics.* 2007; 3, 211-22.

[258] Moco S, Bino RJ, De Vos RCH, Vervoort J. Metabolomics technologies and metabolite identification. *Trends Anal Chem.* 2007; 26:855-866.

[259] Naz S, Vallejo M, García A, Barbas C. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *J Chromatogr A* 2014; 1353:99-105.

[260] Sangster T, Major H, Plumb R, Wilson AJ, Wilson ID. A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabolomic analysis. *Analyst.* 2006; 131:1075-1078.

[261] Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, et al. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm Res.* 2007; 24:1962-1973.

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ciclos biogeoquímicos de los metales pesados.

Figura 2. Estructura molecular de los fármacos estudiados en esta Tesis.

Figura 3. La cascada de las ómicas y el esquema simplificado de un sistema biológico y ciencias –ómicas.

Figura 4. Relación entre el análisis de especiación, la metalómica y sus áreas específicas de bioanálisis.

Figura 5. Esquema del incremento de la complejidad molecular en metalómica.

Figura 6. Evolución de las publicaciones sobre metabolómica ambiental desde 2001.

Figura 7. Anatomía interna de un molusco bivalvo.

Figura 8. Morfología y anatomía interna de un cangrejo de río.

Figura 9. Ejemplares de *Scrobicularia plana*.

Figura 10. Ejemplares de *Ruditapes philippinarum*.

Figura 11. Ejemplar de *Procambarus clarkii*.

Figura 12. Biomarcadores a diferentes niveles de organización biológica, y diferentes escalas temporales.

Figura 13. Participación relativa de diferentes enzimas de fase 1 en el metabolismo xenobióticos

Figura 14. Estructura de las metaloproteínas

Figura 15. Muestreo de bioindicadores.

Figura 16. Rotura del muro de contención de la balsa minera de Aznalcóllar.

Figura 17. Lince ibérico y marisma en Doñana

Figura 18. Metodologías analíticas utilizadas en metalómica

Figura 19. Esquema del equipo de ICP-ORC-MS con celda de colisión/reacción.

Figura 20. Representación gráfica de la elución en SEC.

Figura 21. Representación gráfica de la cromatografía de intercambio iónico.

Figura 22. Esquema de trabajo simplificado de un experimento metabolómico.

Figura 23. Complementariedad de las técnicas de ionización más empleadas en metabolómica.

INTRODUCCIÓN

Figura 24. Validación de un método metabolómico mediante el empleo de muestras de control de calidad (cuadrados negros). (A) Agrupación de QCs en PCA; (B) predicción de QCs en PLS-DA.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplo de biomarcadores, aparición en el tiempo y tipo de repuesta, nivel de organización biológica al que pertenecen y sus niveles de detección.

**CAPÍTULO 1: Estudio de la respuesta
biológica del molusco bivalvo *Scrobicularia plana*
al estrés medioambiental utilizando un enfoque
metalómico**

I. ANTECEDENTES

El suroeste de la Península Ibérica se caracteriza por la presencia de diversos ambientes acuáticos, estuarios y marismas donde la presencia de contaminantes es crítica y puede afectar seriamente la calidad ambiental de estos sistemas y la biota que vive ellos. Debido a la importancia socioeconómica que conlleva el cultivo de moluscos en estas zonas costeras es de gran interés conocer la presencia de contaminantes en los mismos y sobre todo su respuesta a nivel biológico.

Con este objetivo se desarrollaron herramientas analíticas dentro del subproyecto “Estudio de contaminantes emergentes en ecosistemas costeros y estuarinos del suroeste de la Península Ibérica (EMECORISK)”, dentro del proyecto transfronterizo I2TEP en el que participaron tres socios que ha contribuido al conocimiento de la situación medioambiental del arco atlántico: Universidad de Huelva - Universidad del Algarve- Institutos de Ciencias Marinas (Cádiz). El proyecto EMECORISK, constituye un trabajo integrado desde el punto de vista metodológico buscando la aplicación conjunta de herramientas de análisis emergentes, multiespeciación y metalómica con técnicas de estudios proteómicas y el estudio de nuevos biomarcadores.

La concentración de metales trazas (As, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb y Zn) en sedimentos del suroeste de la Península Ibérica han sido estudiados en 2006 y 2007 en las mismas estaciones de muestreo (excepto en el río Arade) [1]. Estos estudios se complementan con los realizados tras el vertido tóxico de la mina de Aznalcóllar [2, 3].

Por otro lado, se ha comprobado que la presencia de metales (Co, Hg, Mo, Ni y Zn) en las conchas del bivalvo *Scrobicularia plana* se ha reducido desde 1999, en que se produjo el accidente de Aznalcóllar, hasta 2007. Sin embargo, el contenido de metales en los tejidos blandos no siguió la misma tendencia decreciente que indica que los tejidos blandos presentan una diferente capacidad de acumular metales procedentes del medio ambiente [4].

El uso de *Scrobicularia plana* como bioindicador de contaminación por metales se refleja en la bibliografía en tanto al uso de biomarcadores de contaminación por metales [5], como la metalotioneína [6], en experiencias de exposición a metales, como Zn [7], Cu [8] y Hg [9]; y en experiencias de simulación de vertido de metales pesados bajo condiciones estuarinas [10].

En base a todo lo considerado, en el presente capítulo se abordará, como se ha comentado en el Objetivo 1, el seguimiento y evaluación de la contaminación ambiental en 6 zonas de la costa del Suroeste de la Península Ibérica, estudiando las modificaciones que se producen en las metalobiomoléculas presentes en la almeja *Scrobicularia plana*, utilizando un procedimiento metalómico basado en el acoplamiento de un sistema cromatográfico de

CAPÍTULO 1

exclusión de tamaño (SEC) con un sistema de detección multielemental, ICP-MS, metodología no aplicada hasta ahora en la zona en estudio. En concreto, se desarrollarán un método multielemental para Cu, Zn, Fe, As, Mn, Co y Se en extractos citosólicos basado en el uso de ICP-MS y un método para la determinación de las biomoléculas unidas a Cu, Zn y As mediante SEC-HPLC-UV-ICP-MS.

II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

2.1.1. Instrumentación empleada para la preparación de muestra

La preparación de extractos citosólicos a partir de glándulas digestivas de *Scrobicularia plana* se lleva a cabo mediante homogenización criogénica con un criohomogeneizador modelo SPEX SamplePrep Freezer/ Mill 6770 (Metuchen, Nueva Jersey, EE.UU.).

Las biomoléculas presentes en este órgano criohomogenizado se extraen con un homogenizador teflón-vidrio. Los extractos citosólicos se someten a ultracentrifugación (a 45.000 rpm), lo cual es ya suficiente para separar proteínas pequeñas), mediante el uso de una ultracentrífuga Beckman L9-90K DE Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) provista de un rotor Beckman 70.1 Ti (Beckman Coulter) y tubos de policarbonato de 10 ml (Beckman Coulter).

La determinación de metales totales en extractos citosólicos se lleva a cabo mediante mineralización de las muestras en reactor cerrado de teflón modelo MARSXpress utilizando un horno de microondas modelo MARS (CEM corporation, Matthews, Carolina del Norte, Estados Unidos). El extracto resultante de las muestras de extracto citosólico de glándula digestiva se filtra a través de filtros Iso-Disc poly-(vinylidene difluoride) (PVDF) de 25 mm de diámetro y 0,2 µm de tamaño de poro (Sigma Aldrich), antes de su análisis mediante SEC-ICP-MS.

Las medidas de pH en todas las disoluciones se lleva a cabo con un pH metro modelo Crison micropH 2000 (Crison Instruments, S.A. Barcelona, España).

2.1.2. Instrumentación empleada para las separaciones cromatográficas

La separación cromatográfica por exclusión de tamaño se lleva a cabo con una columna adecuada en función del rango de fraccionamiento y sus dimensiones. El uso de columnas analíticas (debido a su menor tamaño) es adecuado para el estudio preliminar de los extractos citosólicos.

La columna utilizada posee un rango efectivo de separación de 3-70 KDa Superdex™ 75 10/300 GL (10 x 300 mm x 13 µm), suministrada por GE Healthcare (Uppsala, Suecia), que permite la separación de moléculas de peso molecular intermedio unidas a diferentes metales como Cd, Zn o Cu. La fase estacionaria consta de moléculas de dextrano unidas covalentemente a agarosa fuertemente enlazada.

CAPÍTULO 1

Para las separaciones cromatográficas a escala analítica se emplea un cromatógrafo líquido de alta presión HPLC 1100 Series de Agilent (Wilmington, DE, USA), equipado con un detector UV, válvula de inyección modelo 7725i Rheodyne (Supelco, Bellefonte, PA, USA) y bomba cuaternaria.

2.1.3. Espectrómetro de masas atómico

La detección de metales totales y metales unidos a biomoléculas en los extractos citosólicos de tejidos de bivalvos se realiza con un espectrómetro de masas atómicas ICP-MS Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokio, Japón), equipado con celda de colisión/reacción de tipo octapolo (ORC), lo que permite reducir significativamente las interferencias poliatómicas formadas a partir de la matriz de la muestra, reactivos utilizados para la preparación de la muestra o gases del plasma.

Como gas de reacción se usó hidrógeno, adecuado para eliminar las interferencias de Fe y Se. Como gas de colisión se usó helio, que al ser un gas inerte no reacciona con la matriz de la muestra y no origina nuevas interferencias. Este gas elimina múltiples interferencias y puede ser aplicado a todas las matrices y a todas las muestras utilizando condiciones analíticas comunes.

La introducción de la muestra en la corriente de gas del plasma se lleva a cabo mediante el uso de un nebulizador MicroMist de Glass Expansion (Melbourne, Australia) que permite un caudal líquido de 0,05 a 0,8 ml/min y un caudal gaseoso entre 0,7 y 1 L/min. Este sistema mejora considerablemente la relación señal/ruido, minimiza el gasto de argón y tienen una elevada tolerancia a las sales disueltas. Otra ventaja de este nebulizador es su fácil acoplamiento con el sistema HPLC. Sin embargo, este nebulizador presenta algunas desventajas ligadas a su pobre resistencia al ácido fluorhídrico porque está fabricado con vidrio, se obtura fácilmente por acumulación de micropartículas o sólidos disueltos y su precio es elevado.

Antes de cada análisis el ICP-MS se calibraba en modo estándar con una disolución de calibración de 1 µg /L de Li, Y, Co, Ce y Tl en 2% HNO₃, seguido de una optimización en modo He, y otra en modo H₂, en función del gas usado para el estudio. De esta manera se ajustan los parámetros más importantes del equipo de los cuales depende la sensibilidad de éste como son la posición de la antorcha, flujo de gas y posición de las lentes extractoras.

La monitorización de la señal se lleva a cabo mediante los isótopos ⁷Li, ⁸⁹Y y ²⁰⁵Tl, que permite cubrir todo el rango de masas que mide el equipo.

Los valores típicos de sensibilidad obtenidos para una disolución de 1 µg/L de Li, Y, Tl y Ce, en modo estándar (sin celda colisión/reacción) son para ${}^7\text{Li} > 4000$ cps (cuentas por segundo), ${}^{89}\text{Y} > 8000$ cps y ${}^{205}\text{Tl} > 5000$ cps, siendo la RSD menor del 10% en los tres casos. El nivel de óxidos (MO+) se mide a partir de la relación CeO/Ce, ya que el ${}^{140}\text{Ce}$ se une al oxígeno (O_2) formando un enlace muy fuerte, siendo CeO muy estable en el plasma. Por tanto esta relación nos informa sobre la presencia de óxidos generados en el plasma, debiendo ser inferior al 2%. La reducción de dobles cargas M^{2+} se optimiza a un porcentaje inferior al 2,5% teniendo en cuenta la relación $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^+$.

Los valores de sensibilidad obtenidos para el modo He son superiores a 2000 cps para ${}^{59}\text{Co}$, siendo la RSD inferior al 10%. Los valores de sensibilidad obtenidos en modo H_2 son para ${}^{89}\text{Y}$ superiores a 2000 cps, con una RSD inferior al 10%.

La optimización del flujo del gas de reacción/colisión para la determinación de elementos totales, se llevó a cabo mediante la preparación de una muestra (extracto citosólico de órganos) dividida en dos alícuotas de 5 mL previamente mineralizadas. A una de las alícuotas se le añaden los elementos de interés a una concentración de 10 µg/L, y a la otra se le añadió un volumen igual de agua Milli-Q obteniendo así la misma dilución en ambas alícuotas, y por tanto la misma matriz. Utilizando estas disoluciones se realizan medidas con el ICP-MS aplicando de forma automática una rampa de flujo de gas de reacción/colisión. La gráfica de sensibilidad (cps) de los distintos isótopos de interés, utilizando la muestra fortificada con de dichos isótopos, se compara con las señales obtenidas de las muestras no fortificadas y la señal correspondiente a la concentración equivalente al ruido de fondo (BEC), frente al flujo de gas de colisión/reacción (mL/min). El flujo de gas óptimo se selecciona de manera que la sensibilidad de los isótopos, tanto en la disolución fortificada como no fortificada, sea máxima y al mismo tiempo que la BEC sea mínima.

2.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES PATRÓN

Todas las disoluciones acuosas se preparan en agua ultrapura (18,2 MΩ) obtenida mediante un sistema Milli-Q Gradient de Millipore (Watford, Reino Unido) y todos los reactivos utilizados son de la mayor pureza disponible.

Para la mineralización de la muestra se utilizó ácido nítrico (65 %) y agua oxigenada (30 %) suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), benzonasa (Ultrapure grade), así como hidrocloreuro de tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (BioUltra grade, > 98%) utilizado en la

CAPÍTULO 1

preparación de extractos citosólicos fueron suministradas por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

El acetato amónico (Suprapure grade) para la preparación de la fase móvil en SEC, amoniaco (Suprapur grade) y ácido clorhídrico para ajustar el pH de las disoluciones, fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

La fase móvil para SEC se preparó diariamente y se filtró a vacío mediante filtros de membrana de nitrato de celulosa (tamaño de poro de 0,45 μm) (Sartorius, Epson, Reino Unido) antes de su uso.

Las columnas de exclusión de tamaño se calibraron con los siguientes patrones:

Ferritina (440 KDa, pureza 95%), albumina de suero bovina (BSA) (67 KDa, pureza $\geq 96\%$), superóxido dismutasa (SOD) (32KDa, pureza 70%), metalotioneina I (7 KDa, pureza $\geq 95\%$), L-glutatión reducido (307 Da, pureza 98 %) y arsenobetaína (179 Da, pureza $\geq 98\%$). Todos fueron suministrados por Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania) excepto la metalotioneina I, que fue suministrada por Enzo Life Sciences (Madrid) y la arsenobetaína que fue suministrada por Merck (Darmstadt, Alemania).

La metalotioneina I (Enzo Life Sciences, Madrid), aislada de hígado de conejo, conteniendo un 9% de Cd y Zn.

La sintonía del ICP-MS se realizó con una disolución de Li, Y, Tl y Ce al 2% en HNO_3 suministrada por Agilent Technologies (California, Estados Unidos), empleando una concentración de 1 $\mu\text{g/L}$.

Los gases utilizados (argón, helio e hidrógeno) fueron de la más alta calidad comercial posible, siendo suministrados por Air Liquide España, S.A (Madrid, España).

Para la determinación de metales totales en extractos citosólicos, se utilizó una disolución primaria multipatrón-2A que contenía todos los elementos de interés (10 mg/mL en 2% HNO_3 , Agilent Technologies, California, Estados Unidos), a partir de la cual se prepararon las disoluciones para las rectas de calibrado.

2.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

2.3.1. Zonas de muestreo de moluscos bivalvos (*Scrobicularia plana*)

El muestreo de almejas (*Scrobicularia plana*) se realizó en distintas áreas localizadas en marismas y ecosistemas acuáticos de la región transfronteriza de España y Portugal. Se

muestrearon dos zonas suroeste de la Península Ibérica (figura 1) durante el período de Marzo y Abril, en dos años distintos. De manera más específica, la tabla 1 muestra las coordenadas UTM de cada zona de muestreo.

En el año 2011:

- Área de Portugal (Algarve, España)

- La Ría Formosa: donde se ha muestreado en dos puntos Ribeira de Ramalhete-Faro y Almargem-Tavira (rojo y azul respectivamente); es una gran laguna de marea, declarada Parque Natural; la parte occidental de la laguna está delimitada por una zona densamente urbanizada rodeada de tierras agrícolas.

- El estuario inferior del río Guadiana (Ponte Internacional)(verde oscuro): frontera natural entre Portugal y España, se encuentra casi en su totalidad en el dominio central (Faja Pirítica Ibérica) de la zona sur portuguesa, se ve afectado por el drenaje ácido de minas, los procesos de coagulación/precipitación inducidos por sal naturales.

- El estuario del Río Arade (morado): recibe las aguas residuales tratadas de la ciudad adyacente de Portimao; y en los últimos años, ha habido un aumento en las prácticas en piscifactorías que liberan nutrientes y compuestos químicos en la zona.

- Área de España (Cádiz)

- Caño de Sancti-Petri (Puente Zuazo) (celeste): es también Parque Natural, la contaminación procede de su proximidad a los asentamientos humanos y a la alta actividad económica e industrial, que se ha diversificado por la incorporación de otras industrias que utilizan metales, tales como la fabricación de componentes de vehículos y aeronaves

- Río Guadalquivir (verde claro): cuyo último afluente es el Río Guadiamar, refleja las consecuencias del vertido tóxico sobre el río originado por la ruptura de la balsa de residuos de la mina de Aznalcóllar en 1998 [11].

En el año 2010 se muestrea en el Caño de Sancti-Petri (Puente Zuazo).



Figura 1. Localización de los puntos de muestreo: Río Arade (morado); río Ramalhete (rojo); río Almagem (azul); río Guadiana (verde oscuro); río Guadalquivir (verde claro) y Caño de Sancti-Petri (Puente Zuazo) (celeste)

Área	Coordenadas UTM	
	X	Y
Río Arade	542902	4110732
Ramalhete	601216	4095626
Ribeira de Almagem	625624	4108802
Río Guadiana	640088	4122424
Río Guadalquivir	738619	4039361
Puente Zuazo	752063	4039361

Tabla 1. Coordenadas UTM de las zonas de muestreo estudiadas

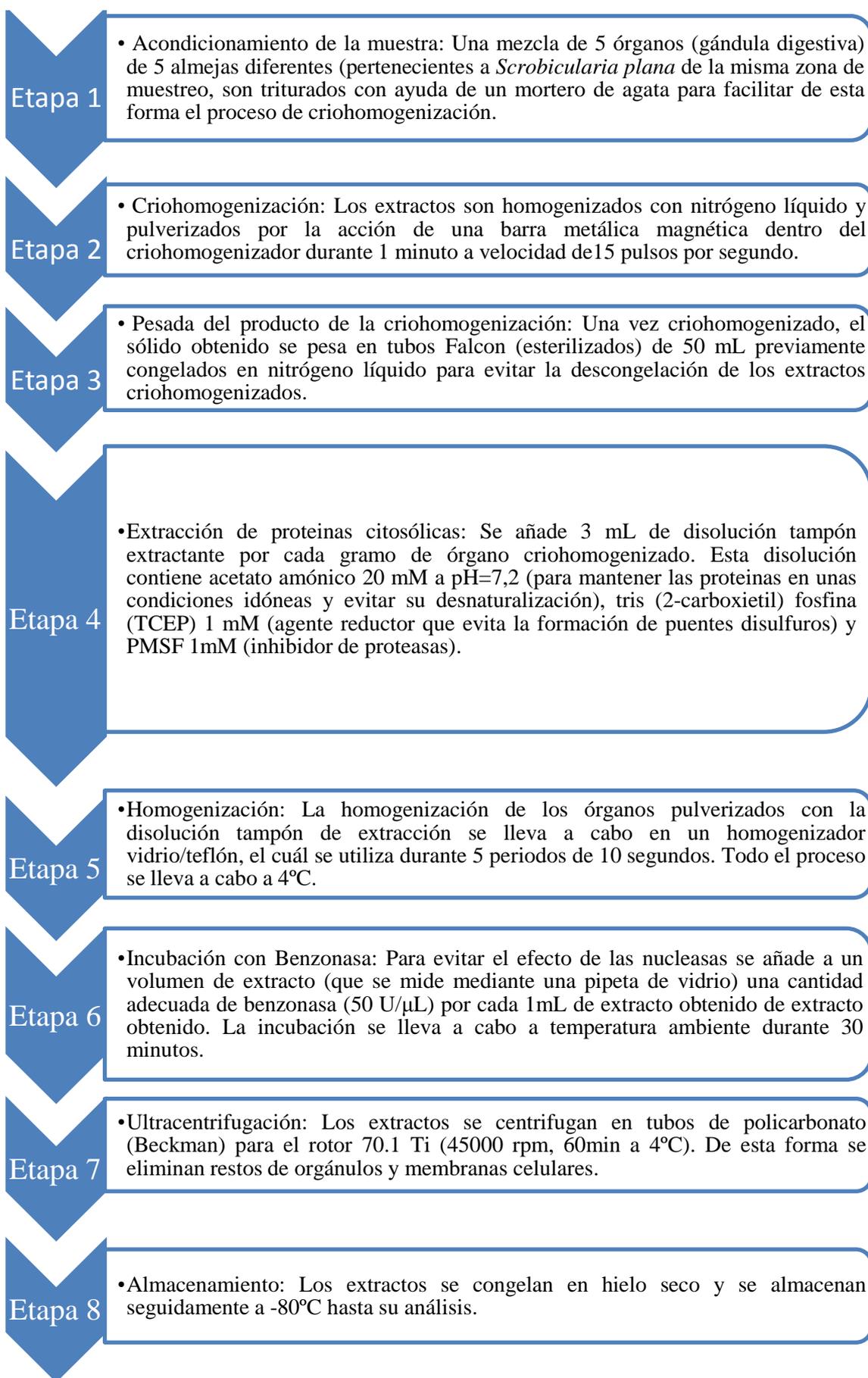
La captura de las almejas (de tamaño homogéneo) se hizo manualmente y se transportaron al laboratorio dentro de 1-2 horas después de su captura.

2.3.2. Manipulación de los animales de experimentación y tratamiento de los órganos.
Preparación de extractos citosólicos.

Durante el transporte al laboratorio las almejas se colocan en neveras portátiles refrigeradas [12]. En el laboratorio las almejas se lavaron con agua de mar y se estabularon con

agua de mar en flujo continuo para la eliminación de partículas en el tracto digestivo. Después de un período de purga de 36 h, durante el cual los metales unidos a sedimentos se extrajeron del intestino, los animales se lavaron con agua destilada. Posteriormente se extrajeron las conchas, se diseccionaron utilizando un bisturí de cerámica transfiriendo rápidamente la glándula digestiva a hielo seco. Se pesaron en viales Eppendorf, se volvieron a lavar con una disolución de NaCl al 0,9%, y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80°C hasta su estudio.

En total, se utilizaron las glándulas digestivas de 5 muestras diferentes de almejas de cada área. El procedimiento de preparación de extractos citosólicos optimizado en este estudio consta de una serie de etapas que se describen a continuación:



2.3.3. Determinación del contenido total de metales en los extractos citosólicos de glándula digestiva de *Scrobicularia plana*

Para la determinación del contenido total de metales en los extractos de glándula digestiva de *Scrobicularia plana* se pesaron exactamente 0,250 g del extracto en reactores de teflón MiniExpress de 5 mL del microondas MARS (CEM). Posteriormente se añaden 800 μ L de una mezcla de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (4:1 v/v). Tras 10 minutos de predigestión en recipiente abierto, se lleva a cabo el ataque en horno de microondas. La muestra se mineraliza a una potencia de 400 W y una rampa de temperatura que va desde temperatura ambiente a 160 ° C durante 15 min, manteniendo esta temperatura durante 40 min. A continuación, los extractos mineralizados se trasvasan a matraces aforados de 2 ml donde se enrasan con agua ultrapura. Estas disoluciones se filtran con filtros hidrófilos PVDF 0,45 μ m antes de su análisis mediante ICP-MS. El análisis se llevó a cabo mediante adición de rodio (Rh) como patrón interno a una concentración de 1 μ g/ ml. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Las condiciones operacionales óptimas para el análisis del contenido total de metales en los extractos citosólicos de hígado y riñón se resumen en la tabla 2.

2.3.4. Análisis de los extractos citosólicos mediante cromatografía de exclusión de tamaño

En primer lugar, los extractos se filtraron con filtros Iso-Disc PVDF (diámetro 25mm, 0,2 μ m tamaño poro) para evitar la sobrecarga y el atasco de la columna, como se indicó anteriormente. La detección molecular y elemental de las biomoléculas presentes se llevó a cabo mediante detectores UV e ICP-MS, respectivamente. El acoplamiento en línea SEC-UV-ICP-MS se realizó conectando la salida del detector UV a la entrada del nebulizador del ICP-MS mediante 30cm de tubo PEEK (0.17i.d.) (figura 2).

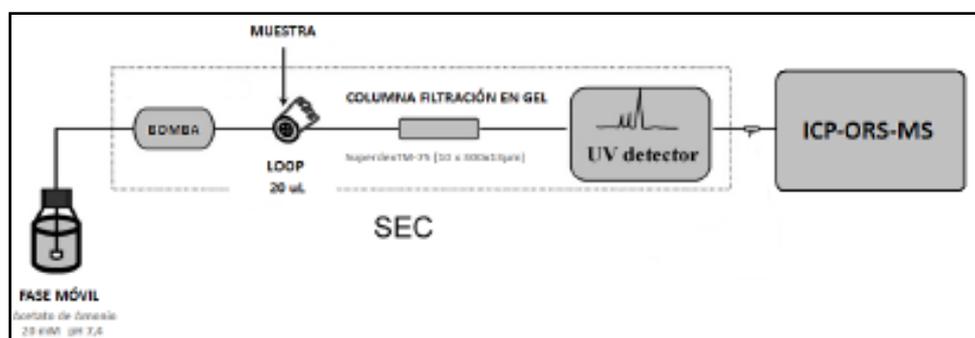


Figura 2. Diagrama esquemático del acoplamiento SEC-HPLC-UV-ICP-ORS-MS usado en este estudio.

CAPÍTULO 1

La sintonía del ICP-MS se realizó añadiendo Li, Y, Ce y Tl (10 µg/mL) a la fase móvil (acetato de amonio 20 mM a pH 7,4) usando un flujo de 0,7 mL/min. La fase móvil se preparó diariamente ajustando el pH con una mezcla NH₃/H₂O ultrapura 1:1. Las condiciones operacionales usadas en este acoplamiento se encuentran resumidas en la tabla 2.

<i>Condiciones experimentales SEC analítica</i>			
Columna	Superdex™ -75 (300 x 310 mm x13µm)		
Rango de resolución	3-70 KDa		
Fase móvil	Acetato de amonio 20 mM (pH 7.4)		
Flujo	0.7 mL min ⁻¹		
Volumen de inyección	20 µL		
Visible wavelength	254 nm		
<i>Condiciones experimentales ICP-MS-ORS-MS</i>			
Foward power	1500 W	Flujo He	3.9 mL min ⁻¹
Flujo Plasma gas	15.0 L min ⁻¹	Flujo H ₂	3.5 mL min ⁻¹
Flujo Auxiliary gas	1.0 L min ⁻¹	Q _{oct}	-18 V
Flujo Carrier gas	0.9 L min ⁻¹	Q _p	-16 V
Profundidad de muestreo	8 mm	Tiempo de análisis	0,3 por isotopo
Conos sampling y skimmer	Ni	Isótopos monitorizados	Usando He como gas de colisión: ⁵⁵ Mn, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁶⁴ Zn, ⁶⁶ Zn, ⁷⁵ As, ⁵³ Cr, ⁵⁷ Fe, ⁸² Se, ¹¹⁴ Cd, ¹⁰³ Rh Usando H2 como gas de reacción: ⁵⁶ Fe, ⁸⁰ Se

Tabla 2. Condiciones experimentales usadas para SEC e ICP-MS.

Los tiempos de retención correspondientes a los calibrantes de masa molecular empleados para la columna Superdex 75 (3-70 kDa) y su curva de calibración usando las condiciones cromatográficas descritas previamente se muestra en la figura 3.

Tras la calibración de las columnas de exclusión cromatográfica se analizaron los diferentes extractos citosólicos.

Proteínas	Masa molecular (KDa)	Tiempo de retención (min)	Metal monitorizado
Ferritina	440	11,5	Fe
Albúmina de suero bovino (BSA)	67	13,7	Cu y Zn
Metalotioneína	32	16,3	Cu y Zn
Glutathión reducido	0,303	21,0	Cu, Zn y Cd
Arsenobetaina	0,179	26,1	As



Figura 3. Tiempos de retención de los calibrantes para la columna Superdex 75 y su correspondiente curva de calibración.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La monitorización de contaminantes en el medio ambiente proporciona, por un lado, información sobre los posibles efectos tóxicos de los metales presentes en dicho medio, y por otro lado nos ayuda a conocer áreas de impacto y lugares donde la concentración de los mismos es más marcada. También es útil conocer la evolución temporal de la presencia de estos contaminantes, ya que los resultados obtenidos nos permiten relacionar la presencia de una sustancia tóxica concreta con posibles problemas medioambientales. En el trabajo experimental descrito se ha desarrollado un procedimiento metalómico para evaluar la contaminación ambiental en el Suroeste de la Península Ibérica, usando como especie bioindicadora la almeja *Scrobicularia plana*, debido a su alta densidad de población en esta zona. Este procedimiento nos permite llevar a cabo estudios comparativos acerca de la respuesta biológica de los organismos frente a los contaminantes. Las zonas de muestreo en este estudio se presentan en la figura 1, éstos fueron seleccionados por la presencia diferencial de contaminantes.

3.1. CONCENTRACIÓN DE METALES TOTALES EN LOS EXTRACTOS DE GLÁNDULA DIGESTIVA

Los resultados de los metales totales de muestras de glándulas digestivas procedentes de la zona del Algarve muestran claramente que los niveles más altos de zinc, hierro, arsénico y cobre están en "Arade", seguido por las muestras del Río "Guadiana". Salvo en el caso del cobre, donde la concentración es mayor en "Almargem" que en "Guadiana". Los niveles de concentración de metales en esta área se presentan en la tabla 3.

Además, de todos los puntos de muestreo, "Arade" mostró las concentraciones de metales más altas en la glándula digestiva de almejas. Este río baña la ciudad de Portimão, la ciudad más grande en el oeste del Algarve. Las concentraciones de metales se incrementaron cerca de los centros urbanos y las fuentes de efluentes industriales. En consecuencia, las áreas influenciadas por el río Arade, y el río Guadiana presentaron las más altas concentraciones de metales. Por tanto, las concentraciones de metales en la glándula digestiva de los bivalvos de la costa oeste del Algarve fueron mayores que en los de la costa este. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros bivalvos como los mejillones [13]

	Guadiana	Arade	Almargem	Ramalhete
⁵⁷ Fe	9,903 ± 0,401	14,734 ± 1,211	4,099 ± 1,681	6,888 ± 0,891
⁶³ Cu	0,487 ± 0,160	0,947 ± 0,042	0,729 ± 0,173	0,593 ± 0,190
⁷⁵ As	2,683 ± 0,600	4,418 ± 0,940	0,809 ± 0,340	1,603 ± 0,642
⁶⁶ Zn	79,476 ± 5,931	106,048 ± 16,71	42,629 ± 9,990	33,178 ± 5,161
⁵⁵ Mn	16,388 ± 1,631	16,847 ± 1,543	9,442 ± 1,761	10,442 ± 2,900
⁵⁹ Co	1,340 ± 1,080	4,419 ± 1,112	2,765 ± 0,690	1,139 ± 0,171
⁷⁸ Se	0,752 ± 0,411	1,061 ± 0,740	0,559 ± 0,723	0,482 ± 0,442

Tabla 3. Concentraciones de metales en la glándula digestiva de *Scrobicularia plana* (µg/g peso seco, medias ± SD,) en el área de Portugal (año 2011)

Los resultados obtenidos de los metales totales en extractos citosólicos de muestras del área de Cádiz se muestran en la tabla 4. Los metales de la glándula digestiva se midieron en dos lugares y las muestras de uno de ellos se tomaron en dos años diferentes (2010 y 2011). Las mayores concentraciones de metales fueron encontrados en "Zuazo 2011". Se encontraron concentraciones de metales muy diferentes en "Zuazo 2010" y "Zuazo 2011", aunque los puntos de muestreo sólo distaban 50 m entre sí.

	Zuazo (año 2010)	Zuazo (año 2011)	Guadalquivir (año 2011)
⁵⁷ Fe	1,820 ± 0,611	3,838 ± 2,492	0,150 ± 1,661
⁶³ Cu	0,065 ± 0,173	0,634 ± 0,061	0,070 ± 0,673
⁷⁵ As	0,014 ± 0,031	1,558 ± 0,180	0,101 ± 0,021
⁶⁶ Zn	6,662 ± 1,462	28,876 ± 7,054	6,066 ± 6,983
⁵⁵ Mn	0,014 ± 0,040	9,031 ± 2,270	0,002 ± 0,042
⁵⁹ Co	ND	1,231 ± 2,501	0,197 ± 5,451
⁷⁸ Se	0,333 ± 1,331	0,498 ± 0,843	0,005 ± 0,210

Tabla 4. Concentraciones de metales en la glándula digestiva de *S. plana* (µg/g peso seco, medias ± SD,) en el área de Cádiz (ND:No detectado).

Por tanto, los niveles de metales eran más elevados en la zona de Portugal que en la zona de Cádiz, sobre todo para el hierro, el zinc y arsénico, en el punto con mayor contaminación, con valores cuatro veces mayores. Estas diferencias se aprecian bien en la figura 4, donde se representan las concentraciones de los distintos metales de las zonas muestreadas.

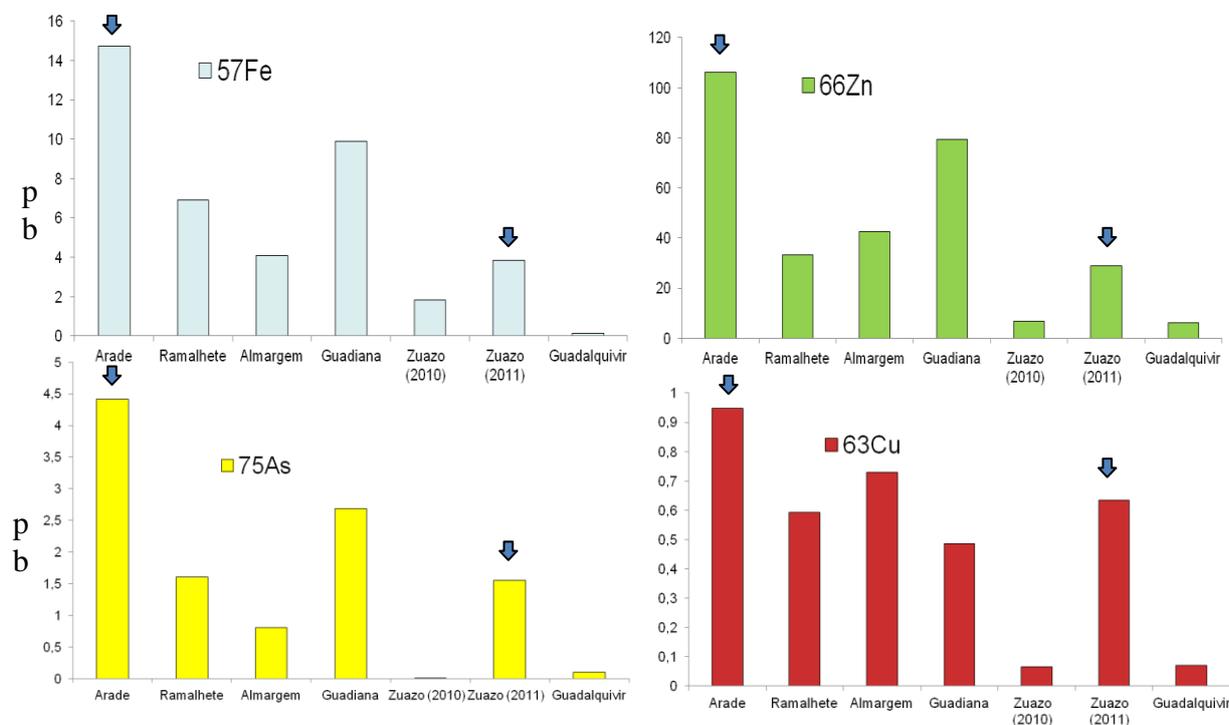


Figura 4. Concentraciones de Fe, Zn, As y Cu en la glándula digestiva de *S. plana* ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en los puntos muestreados en el Suroeste de la Península Ibérica.

Si se comparan estos resultados con los de otros estuarios marroquíes que también sufren la contaminación de metales pesados derivados de la escorrentía de la mina y en base de estudios realizados en *S. plana*, se aprecia que los niveles de zinc y manganeso son muy similares pero el cobre y el hierro son más bajos [14]. De acuerdo con la literatura relacionada, los niveles de zinc dependen de la estación del año y de la reproducción de las especies. Sin embargo, no existe información respecto a los niveles de arsénico en *S. plana*, sólo podemos encontrar valores para arsénico inorgánico en *S. plana* publicados para el río Guadalquivir [15].

Si comparamos las concentraciones de metales en los tejidos *S. plana* con los de otros bivalvos (principalmente en mejillón, *Mytilus edulis*, un molusco bioindicador de uso común), es evidente que los niveles de concentración de Cu y Zn de Portugal y de Cádiz superan las de mejillones (pero no ostras) de la mayoría de las regiones costeras. La medida en que estas diferencias interespecíficas en las concentraciones tisulares son atribuibles a las diferencias fisiológicas entre las especies y en cómo procesan los metales no se conoce profundamente [16].

3.2. PERFILES DE BIOMOLÉCULAS UNIDAS A METALES EN LOS EXTRACTOS DE GLÁNDULA DIGESTIVA

Los resultados más interesantes se han obtenido considerando los perfiles de biomoléculas unidas a metales esenciales como Cu y Zn y otras de carácter tóxico como es el As. Las concentraciones de metales totales en la glándula digestiva (tabla 3-4) se compararon con los perfiles cromatográficos de cada lugar (figura 5) para estos metales.

Los perfiles cromatográficos obtenidos de hierro, selenio y manganeso mostraron un pico intenso y ancho de alta masa molecular y no se observaron moléculas unidas a metales a otros tiempos de retención.

Los perfiles cromatográficos de Cu, Zn y As de los extractos de glándula digestiva de *S. plana* (figura 8) de ría Formosa (Almargem y Ramalhe), río Guadiana y el río Arade en el área de Portugal muestran la presencia de metalobiomoléculas de baja masa molecular unidas a Cu y Zn, con un tiempo de retención en torno a 300 Da que pueden estar relacionadas con la presencia de glutatión unido a estos metales. Sin embargo, estas metalobiomoléculas no aparecen en los perfiles de la zona de Cádiz. La respuesta de biomoléculas unidas a Cu y Zn es más marcada en el área de Portugal que en la de Cádiz.

El pico de una masa molecular aproximada al tiempo de retención de 300 Da también se encuentra en los perfiles cromatográficos de As, que indica la presencia de metabolitos de As, como arsenobetaina y arsenocolina tanto en las zonas de Portugal como de Cádiz.

En varias muestras se ha observado la presencia de un pico de gran intensidad que contiene Cu de aproximadamente 7 kDa. Las concentraciones totales de metales son más altas en el río Arade (Portugal), que está situado cerca de una zona industrial, y en el punto de muestreo Cádiz cerca del puente Zuazo en el año 2011. Sin embargo, el pico de Cu de aproximadamente 7 kDa tiene la misma intensidad (cps) en "Zuazo 2011" en comparación con el "Guadalquivir".

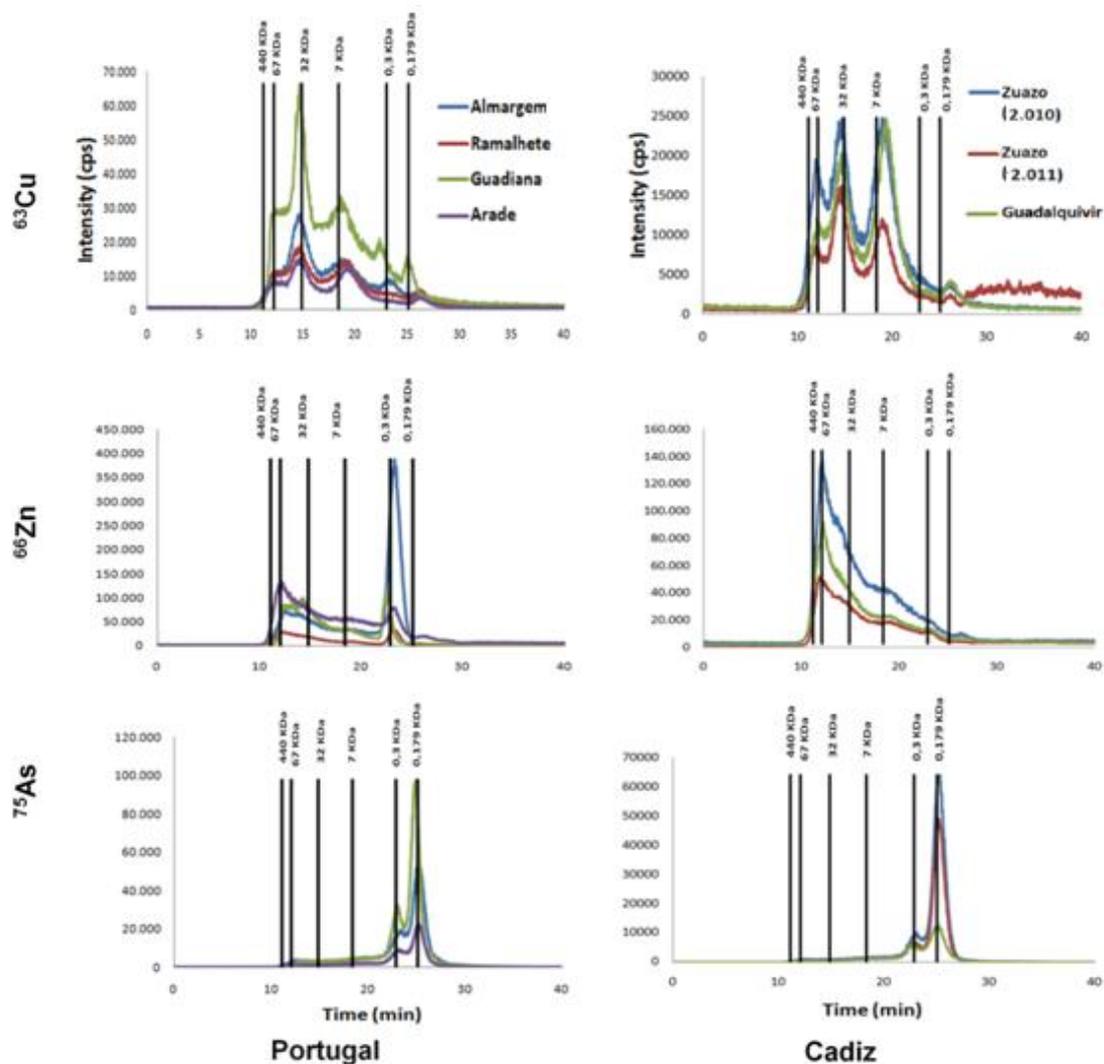


Figura 5. Perfiles de metallobiomoléculas unidas a cobre, zinc y arsénico obtenidos por SEC-HPLC-UV-ICP-ORS-MS en extractos de la glándula digestiva de *S. plana* de las zonas de Portugal y Cádiz. Los números corresponden a los estándares de peso molecular conocido: 440 kDa, 67 kDa , 32 kDa , 7 kDa , 0,3 kDa y 0,179 kDa.

IV. CONCLUSIONES

La función de la glándula digestiva en *Scrobicularia plana* como órgano para el almacenamiento de metal permite proponer a este órgano como modelo para futuros estudios sobre la contaminación metálica. Constituyendo esta especie un buen bioindicador de contaminación ambiental, que ya ha sido propuesto a nivel europeo. El estudio metalómico de este órgano constituye una herramienta nueva de gran utilidad para el estudio de la respuesta biológica a la contaminación.

Sin embargo, existen dificultades relacionadas con el tamaño muestral, la temperatura del agua, salinidad de la misma, influencia del sexo e interacción con otros elementos traza que limitan la interpretación de los resultados [17].

La presencia de metales (Cu, Zn, As) en la glándula digestiva de *Scrobicularia plana* de la zona de Portugal es más elevada que en la zona de Cádiz, en general los valores son mayores en “Arade” y en el río “Guadiana”, respectivamente.

La expresión de metalobiomoléculas en extractos citosólicos de glándula digestiva no se puede relacionar directamente con el contenido de metales totales.

Las biomoléculas que contienen metales difieren en las zonas de Portugal y Cádiz. La intensidad de las señales es generalmente mayor en muestras de la zona portuguesa.

Es notable la presencia de biomoléculas unidas a As (de baja masa molecular), que pueden estar relacionadas con la presencia de arsenobetaína y arsenocolina en estos bivalvos.

V. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Blasco J, Gomes T, García-Barrera T, Rodríguez-Romero A, González-Rey M, Morán-Roldán F, et al. Trace metal concentrations in sediments from the southwest of the Iberian Peninsula. *Sci. Mar.* 2010; 74(S1):99–106.
- [2] Tovar-Sánchez A, Huerta-Díaz MA, Negro JJ, Bravo MA, Sañudo-Wilhelmy SA. Metal contamination in interstitial waters of Doñana Park. *J Environ Manage.* 2006; 78(3):286–293.
- [3] Riba I, Casado-Martínez MC, Blasco J, DelValls TA. Bioavailability of heavy metals bound to sediments affected by a mining spill using *Solea senegalensis* and *Scrobicularia plana*. *Mar Environ Res.* 2004; 58(2-5), 395–399.
- [4] Pérez-Mayol S, Blasco J, Tornero V, Morales-Nin B, Massanet A, Tovar-Sánchez A. Are the shells of *Scrobicularia plana* useful for monitoring trace metal pollution events?. *J. Environ. Biol.* 2014; 35:9–17.
- [5] Pérez E, Blasco J, Solé M. Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cádiz bay (SW Spain). *Mar Environ Res.* 2004; 58(2-5):275–9.
- [6] García-Luque E, DelValls AT, Forja JM., Gómez-Parra A. Biological adverse effects on bivalves associated with trace metals under estuarine environments. *Environ Monit Assess.* 2007; 131(1-3):27–35.
- [7] Ent M, Akberali, HB, Wosg TM, Trueman ER, Road O, Britain G. Behavioural and siphonal tissue responses of *Scrobicularia plana* (bivalvia) to zinc. *Mar Environ Res.* 19815, 251–264.
- [8] Akberali HB, Black JE. Behavioural responses of the bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa) subjected to short-term copper (Cu II) concentrations. *Mar Environ Res.* 1980; 4(2):97–107.
- [9] Ahmad I, Coelho JP, Mohmood I, Pacheco M, Santos MA, Duarte AC, et al. Immunosuppression in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* environmentally exposed to mercury and association with its accumulation. *Chemosphera.* 2011; 82(11):1541–6.
- [10] García-Luque E, DelValls TA, Casado-Martínez C, Forja JM, Gómez-Parra A. Simulating a heavy metal spill under estuarine conditions: effects on the clam *Scrobicularia plana*. *Mar Environ Res.* 2004; 58(2-5):671–4.
- [11] Grimalt JO, Ferrer M, MacPherson E. Special issue: the mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci Total Environ.* 1999; 242:3–11.

CAPÍTULO 1

[12] Sacchi A, Mouneyrac C, Bolognesi C, Sciutto A, Roggieri P, Fusi M, et al. Biomonitoring study of an estuarine coastal ecosystem, the Sacca di Goro lagoon, using *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Environ Pollut.* 2013; 177:82-89.

[13] Machado LM, Bebianno MJ, Boski T, Moura DM. Metales traza en la costa del Algarve II: Bioacumulación en mejillones *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Bol Inst Esp. Oceanogr.* 1999; 15 (1-4):465-471.

[14] Cheggour M, Chafik A, Fisher NS, Benbrahim S. Metal concentrations in sediments and clams in four Moroccan estuaries. *Mar. Environ. Res.* 2005; 59(2):119–37.

[15] Suñer MA, Devesa V, Muñoz O, López F, Montoro R, Arias AM, et al. Total and inorganic arsenic in the fauna of the Guadalquivir estuary. Environmental and human health implications. *Sci Total Environ.* 1999; 242(1-3):261-270.

[16] Amiard JC, Amiard-Triquet C, Berthet B, Metayer C. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1987; 106:73-89.

[17] Luoma SN, Bryan GW. Factors controlling the availability of sediment-bound lead to the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*. *J Mar Biol Assoc U. K.* 1978; 58 (4):793-802.

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Localización de los puntos de muestreo: Río Arade (morado); río Ramalhete (rojo); río Almargem (azul); río Guadiana (verde oscuro); río Guadalquivir (verde claro) y Caño de Sancti-Petri (Puente Zuazo) (celeste)

Figura 2. Diagrama esquemático del acoplamiento SEC-HPLC-UV-ICP-ORS-MS usado en este estudio

Figura 3. Tiempos de retención de los calibrantes para la columna Superdex 75 y su correspondiente curva de calibración.

Figura 4. Concentraciones de Fe, Zn, As y Cu en la glándula digestiva de *S. plana* ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en los puntos muestreados en el Suroeste de la Península Ibérica.

Figura 5. Perfiles de metalobiomoléculas unidas a cobre, zinc y arsénico obtenidos por SEC-HPLC-UV-ICP-ORS-MS en extractos de la glándula digestiva de *S.plana* de las zonas de Portugal y Cádiz.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas UTM de las zonas de muestreo estudiadas.

Tabla 2. Condiciones experimentales usadas para SEC e ICP-MS.

Tabla 3. Concentraciones de metales en la glándula digestiva de *Scrobicularia plana* ($\mu\text{g/g}$ peso seco, medias \pm SD) en el área de Portugal (año 2011)

Tabla 4. Concentraciones de metales en la glándula digestiva de *S. plana* ($\mu\text{g/g}$ peso seco, medias \pm SD) en el área de Cádiz

CAPÍTULO 2: Evaluación de la respuesta biológica del cangrejo *Procambarus Clarkii* sometido a estrés medioambiental mediante biomarcadores convencionales y metalómica

I. ANTECEDENTES

El cangrejo rojo (*Procambarus clarkii*) es una especie que puede vivir en muy diversas condiciones medioambientales, incluso en aguas altamente contaminadas. Este cangrejo fue introducido en marismas del curso bajo del Río Guadalquivir en 1974 y desde entonces se ha extendido rápidamente hasta alcanzar las marismas de agua dulce del Parque Nacional de Doñana (PND) [1]. Aunque el PND ha sido declarado Reserva de la Biosfera por la UNESCO en 1982, no está exento de riesgos, debido a su proximidad a la Faja Ibérica Pirítica que genera drenaje ácido de mina, y al cinturón industrial de Huelva que aporta contaminantes orgánicos, procedentes de las petroquímicas, y vertidos inorgánicos que aportan las restantes industrias presentes en el mismo. Además, esta área se vio afectada por el vertido minero de Aznalcóllar en el río Guadiamar y su repercusión en el estuario del Guadalquivir en 1998. Este vertido afectó unas 4.328 hectáreas a ambas orillas del río Guadiamar [2]. Por todo ello, se ha utilizado el cangrejo *P. clarkii* como bioindicador para evaluar la calidad ambiental del ecosistema acuático del PND.

El estudio considera 6 zonas del Parque Nacional de Doñana y alrededores: (1) Lucio del Palacio (LDP), situada en el centro del Parque, que se considera como zona control no contaminada, teniendo en cuenta estudios previos realizado por este grupo de investigación; (2) Arroyo de La Rocina (ROC); (3) Arroyo de El Partido (PAR); (4) Bernabé (BER); (5) El Ajolí; y (6) El Matochal (MAT), en el entorno de Doñana, con diferentes niveles de contaminación debido a su proximidad a zonas de actividad agrícola, minera e industrial (figura 1).

El estrés ambiental inducido en *P. clarkii* se ha evaluado en estudios previos por el uso de varios biomarcadores moleculares que refleja los efectos de los contaminantes sobre el metabolismo celular [3-4]. Por otro lado, los mismos especímenes muestreados en las áreas bajo estudio se han estudiado para establecer relaciones entre los niveles de metal y la respuesta metabólica del organismo [5]. Estudios previos realizados sobre *P. clarkii* sugieren que la concentración de metales no esenciales en los tejidos del cangrejo en un entorno de humedales refleja la concentración de metales en el sedimento en el que habita [6]. Además, estudios proteómicos anteriores sobre *P. Clarkii* [3], revelaron la regulación positiva de las proteínas en las zonas contaminadas y la inhibición de la enzima esterasa, un biomarcador que indica la presencia de pesticidas [4].

Por otro lado, la determinación y distribución de las especies de arsénico ha sido analizada en trabajos anteriores en *P. clarkii* [7-8] que el 50 % del arsénico se encuentra en forma de arsénico inorgánico más tóxico [7].

CAPÍTULO 2

Teniendo en cuenta todo lo comentado, en el presente capítulo se aborda, como se describe en el Objetivo 2, el seguimiento y evaluación de la contaminación ambiental en las 6 zonas comentadas, considerando las modificaciones que se producen en las metalobiomoléculas presentes en el cangrejo *P. Clarkii* como consecuencia de la contaminación. En este capítulo se desarrollan herramientas analíticas bajo un enfoque integrado que combina la respuesta del cangrejo mediante biomarcadores bien establecidos con un enfoque metalómico basado en el uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SuperdexTM-peptide) con detección del metal unido a la biomolécula mediante ICP-MS en un acoplamiento SEC-ICP-MS, que ha permitido perfiles metálicos relacionados con la sobreexpresión o inhibición de metalobiomoléculas en estos bioindicadores como consecuencia de la contaminación. En concreto, se ha desarrollado un método multielemental para Cu, Zn, As y Cd en glándula digestiva, músculo y branquias de la especie bioindicadora, *P. clarkii*, procedente de las 6 zonas comentadas, mediante ICP-MS, y un método para la determinación de las biomoléculas unidas a Cu, Zn y As en los extractos citosólicos de los distintos órganos por SEC-HPLC-UV-ICP-MS. Además, se estudiaron de forma integrada las respuestas de los biomarcadores bien establecidos (metalotioneína y peroxidación lipídica) en glándulas digestivas. El método se complementa con una segunda dimensión cromatográfica (utilizando cromatografía de intercambio aniónica y catiónica) para el análisis de especies de arsénico en glándulas digestivas de la zona más contaminada y la no contaminada.

II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

2.1.1. Instrumentación empleada para la preparación de muestra

La preparación de extractos citosólicos a partir de los diferentes órganos de cangrejo se lleva a cabo mediante homogenización criogénica con un criohomogeneizador modelo SPEX SamplePrepFreezer/ Mill 6770 (Metuchen, Nueva Jersey, USA).

Estos órganos criohomogenizados se extraen con un homogenizador teflón-vidrio. Los extractos citosólicos se someten a ultracentrifugación mediante el uso de una ultracentrífuga Beckman L9-90K DE BeckmanCoulter (Fullerton, CA, USA) provista de un rotor Beckman 70.1 Ti (BeckmanCoulter) y tubos de policarbonato de 10 ml (BeckmanCoulter).

La determinación de metales totales en órganos de cangrejo, se lleva a cabo mediante mineralización de las muestras en un reactor cerrado de teflón modelo MARSXpress utilizando un horno de microondas modelo MARS (CEM corporation, Matthews, Carolina del Norte, Estados Unidos). El extracto resultante de las muestras de suelo se filtra a través de filtros Iso-Disc poly-(vinylidenedifluoride) (PVDF) de 25 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro (Sigma Aldrich), antes de su análisis mediante ICP-MS. Para filtrar los extractos citosólicos antes de su análisis mediante SEC-ICP-MS se emplean filtros análogos pero de 0,2 µm.

Las medidas de pH en todas las disoluciones se lleva a cabo con un pH metro modelo Crison microPH 2000 (Crison Instruments, S.A. Barcelona, España).

La determinación del contenido de proteínas en los extractos citosólicos de los cangrejos *Procambarus clarkii* se ha llevado a cabo mediante el método de Bradford usando un espectrómetro UV/Vis modelo ThermoSpectronic Helios γ (ThermoScientific, Barcelona).

La determinación de metalotioneínas (MTs) se realizó en un polarógrafo de la firma Metrohm modelo 693 VA. Se empleó como electrodo indicador un multielectrodo de gota colgante de mercurio (HMDE). Los electrodos de referencia y auxiliar utilizados fueron de Ag/AgCl y platino, respectivamente.

Para la extracción de especies de arsénico se utilizó una sonda de ultrasonidos modelo Sonoplus HD UW 2200 (Bandelin Electronic, Berlín, Germany) equipada con una punta MS72. La potencia usada fue de 550 W durante 3 min, el residuo se separó con una centrífuga modelo 5804 R (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

CAPÍTULO 2

2.1.2- Instrumentación empleada para las separaciones cromatográficas

La separación cromatográfica por exclusión de tamaño se lleva a cabo con una columna que ha sido seleccionada en función del rango de fraccionamiento y sus dimensiones. El uso de columnas analíticas (debido a su menor tamaño) es adecuado para el estudio preliminar de los extractos citosólicos.

Se ha utilizado una columna de exclusión de tamaño con un rango efectivo de separación 10 KDa, Superdex™ Peptide 10/300 GL (10 x 300 mm x 13 µm), suministrada por GE Healthcare (Uppsala, Suecia). La columna permite la separación de metalo-moléculas de peso molecular intermedio y de bajo peso molecular como son arsenocompuestos. La fase estacionaria consta de moléculas de dextrano unidas covalentemente a agarosa fuertemente enlazada.

Para las separaciones cromatográficas a escala analítica se emplea un cromatógrafo líquido de alta presión HPLC 1100 Series de Agilent (Wilmington, DE, EE.UU.), equipado con un detector UV, válvula de inyección modelo 7725i Rheodyne (Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.) y bomba cuaternaria.

Para la especiación de arsénico se utilizaron dos columnas cromatográficas distintas, una de intercambio aniónico (PRP X 100, 25 cm x 4.6 mm, 5 m, Hamilton) y otra de intercambio catiónico (Supelcosil LC-SCX, 25 cm x 4.6 mm, 5 m, Supelcosil).

2.1.3- Espectrómetro de masas atómico

La detección de metales totales y metales unidos a biomoléculas en los extractos citosólicos de tejidos de cangrejo se realiza con un espectrómetro de masas atómicas ICP-MS Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokio, Japón), equipado con celda de colisión/reacción de tipo octapolo (ORC). La optimización de la señal analítica y demás parámetros se resumen en el apartado 2.1.3 del Capítulo 1.

2.2- REACTIVOS Y DISOLUCIONES PATRÓN

Todas las disoluciones acuosas se preparan en agua ultrapura (18,2 MΩ) obtenida mediante un sistema Milli-Q Gradient de Millipore (Watford, Reino Unido) y todos los reactivos utilizados son de la mayor pureza disponible.

Para la mineralización de la muestra se utilizó ácido nítrico (65 %) y agua oxigenada (30 %) fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), benzonasa (Ultrapure grade), así como hidrocloreto de tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (BioUltra grade, > 98%) utilizados en la preparación de extractos citosólicos fueron suministradas por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

El acetato amónico (Suprapure grade) para la preparación de la fase móvil utilizada en SEC, amoniaco (Suprapur grade) y ácido clorhídrico para ajustar el pH de las disoluciones, fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

La fase móvil para SEC se preparó diariamente y se filtró a vacío mediante filtros de membrana de nitrato de celulosa (tamaño de poro de 0,45 μm) (Sartorius, Epton, Reino Unido) antes de su uso. La columna de exclusión de tamaño se calibró con los siguientes patrones: Albúmina de suero bovino (67kDa, pureza 96 %), metalotioneína I (7 kDa, pureza ≥ 95 %), vitamina B12 (1.35 kDa, pureza ≥ 96 %), L-glutati3n reducido (0,307KDa, pureza 98 %) y arsenobetaína (0,179 KDa, pureza ≥ 98 %). Todos los patrones fueron suministrados por Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania) excepto la metalotioneina I, que fue suministrada por Enzo LifeSciences (Madrid) y la arsenobetaína por Merck (Darmstadt, Alemania). La metalotioneina I (Enzo LifeSciences, Madrid), ha sido aislada de hígado de conejo, conteniendo un 9% de Cd y Zn.

El bicarbonato de amonio y la piridina para la preparación de la fase móvil para cromatografía de intercambio ani3nico y cati3nico, respectivamente, fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Para la especiación de arsénico el arsenito de sodio y el arsenato de sodio utilizados para la preparación de los patrones de As^{III} y As^{V} , así como la AsB fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El ácidomonometilars3nico (MMA^{V}) y el ácido dimetilars3nico (DMA^{V}) fueron suministrados por Supelco (Bellefonte, Estados Unidos). El ácido dimetilmonotioars3nico (DMA) fue sintetizado y suministrado por las doctoras Vélez y Devesa (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Valencia, Spain). El i3n tetrametilarsonio (TEMA) y el óxido de trimetilarsina (TMAO) fueron donados por la Dra. Riansares Mu3oz (Universidad Complutense de Madrid).

El ajuste del ICP-MS se realizó con una disoluci3n de Li, Y, Tl y Ce al 2% en HNO_3 suministrada por Agilent Technologies (California, Estados Unidos), empleando una concentraci3n de 1 μg /L. Los gases utilizados (arg3n, helio e hidr3geno) fueron de la m3s alta calidad comercial posible, siendo suministrados por Air Liquide Espa3a, S.A (Madrid, Espa3a).

Para la determinaci3n de metales totales en extractos citos3licos, se utiliz3 una disoluci3n primaria multipatr3n-2A que contenía todos los elementos de inter3s (10 mg/mL en 2% HNO_3 , Agilent Technologies, California, Estados Unidos), a partir de la cual se prepararon las disoluciones para las rectas de calibrado.

CAPÍTULO 2

Para la determinación de proteínas en los extractos citosólicos se usó el reactivo Bradford proporcionado por Bio-Rad (Múnich, Alemania) e hidróxido sódico suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania).

2.3- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

2.3.1- Zonas de muestreo de crustáceos (*Procambarus clarkii*)

El muestreo se llevó a cabo en los 6 puntos comentados previamente durante la primavera de 2009 en el Parque Nacional de Doñana y en su entorno, al suroeste de España. La figura 1 muestra el mapa de la Reserva biológica de Doñana con las zonas donde se realizó el muestreo y sus principales fuentes de contaminantes. De manera más específica, la tabla 1 muestra las coordenadas UTM de cada zona de muestreo y datos morfométricos de especímenes muestreados en las áreas bajo estudio.

- Lucio del Palacio (LDP) (punto verde de la figura 1), se encuentra en el corazón de la Reserva Biológica de Doñana, y se considera zona no contaminada de acuerdo con resultados anteriores [31].
- La Rocina (ROC) y Bernabé (BER), situados en el curso alto y bajo del arroyo La Rocina, al noroeste de Doñana. Esta zona presenta una contaminación media por la presencia de áreas agrícolas (campos de fresa, cítricos y viñedos), que aportan metales y plaguicidas a este curso de agua. Además, esta zona está afectada por la contaminación difusa de las actividades petroquímicas y químicas del Polo Industrial de Huelva y por las aguas ácidas y metales que provienen de las actividades metalúrgicas de las minas de Rio Tinto, al noroeste de la provincia de Huelva.
- El Partido (PAR) y El Ajolí (AJO) situados en el curso alto y bajo del arroyo El Partido, respectivamente. Estas zonas están rodeadas de campos de cítricos y viñedos.
- El Matochal (MAT), situado próximo al Río Guadiamar, que está afectado por campos de arroz, y refleja las consecuencias del vertido tóxico sobre el río Guadiamar originado por la ruptura de la balsa de residuos de la mina de Aznalcollar en 1998 [2].



Figura 1. Puntos de muestreo y principales fuentes de contaminación.

Área (código)	Coordenadas UTM		Sexo	Peso (g)	Tamaño (cm)
	X	Y			
Lucio del Palacio (LDP)	193800	4099515	Macho	57.4	11.5
			Macho	57.9	12.0
			Macho	60.4	12.0
Partido (PAR)	191173	4124977	Macho	31.3	10.5
			Macho	28.3	9.5
			Macho	28.0	10.0
Ajolí (AJO)	192352	4124977	Macho	37.0	10.0
			Macho	35.0	10.0
			Macho	39.0	9.5
Bernabé (BER)	187036	4116086	Macho	36.0	10.5
			Macho	27.0	9.5
			Macho	34.5	10.5
Matochal (MAT)	208681	4102207	Macho	28.0	9.5
			Macho	27.5	9.5
			Macho	62.0	13.5
Rocina (ROC)	178653	4119937	Macho	34	10
			Macho	26	9.5
			Macho	33	10.5

Tabla 1. Coordenadas UTM de las zonas de muestreo estudiadas y datos morfométricos de los cangrejos *Procambarus clarkii* capturados en éstas.

CAPÍTULO 2

2.3.2- Manipulación de los animales de experimentación y tratamiento de los órganos. Preparación de extractos citosólicos.

Tres especímenes de cangrejos de río *Procambarus clarkii* fueron capturados por punto de muestreo, utilizando trampas tubulares cebadas con trozos de pollo crudo (figura 2). Los animales adultos (de edad desconocida) fueron capturados con vida y transportados al laboratorio donde se registraron el lugar, el sexo, el peso y las medidas externas (tabla 1).

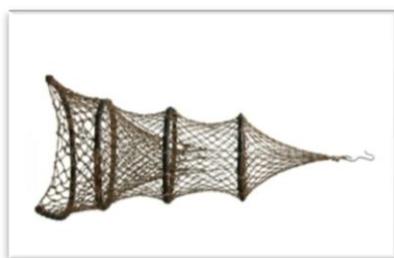


Figura 2. Nasa para cangrejos

Los cangrejos fueron diseccionados utilizando un bisturí de cerámica para obtener tejidos como la glándula digestiva, músculo abdominal, branquias y glándula antenal o glándula verde, que no es más que metanefridios modificados (sistema excretor). Los órganos individuales se pesaron en viales Eppendorf, se limpiaron con una solución de NaCl 0,9 %, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta que se utilizaron su análisis.

Para la preparación de muestra, se agruparon las muestras de glándula digestiva, músculo y branquias de tres cangrejos machos diferentes en cada área; las muestras de glándulas antenales no se utilizaron para este estudio, pero se reservaron para el análisis metabólico descrito en el Capítulo 3, A continuación se obtuvo la fracción citosólica mediante homogeneización criogénica como se describe en el Capítulo 1, Apartado 2.3.2. Los extractos fueron almacenados en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación por el aire y a -80°C hasta su análisis.

2.3.3- Determinaciones bioquímicas.

Para determinaciones de metalotioneína (MT), contenido de proteínas totales y peroxidación lipídica (LPO), en la fracción citosólica de glándula digestiva, las muestras de cada pool de glándula digestiva de cangrejo de los diferentes puntos de muestreo se homogeneizaron con un tampón Tris-HCl 0,02 pH 8,6 (1/3, peso/volumen) que contiene 10 μl

de solución de hidroxitoluenobutilado (BHT) por cada mililitro de Tris-HCl a 4 °C. El homogeneizado se centrifugó a 30.000 g durante 45 min. Las alícuotas del sobrenadante recogido se almacenaron a -80 ° C para evaluar el contenido total de proteínas y la peroxidación lipídica (LPO).

a. Determinación del contenido total de proteínas en glándula digestiva de cangrejos

El contenido total de proteínas en los extractos citosólicos de glándula digestiva de *Procambarus clarkii* se llevó a cabo por el método Bradford basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Se preparó una curva de calibrado con BSA como proteína patrón y reactivo Bradford (Bio-Rad, Múnich, Alemania) que contiene Coomassie Blue G-250, ácido fosfórico y metanol para el desarrollo del color. La preparación de la curva de calibrado se llevó a cabo como se indica en la tabla 2.

	B	1	2	3	4	5	6	7	8
$\mu\text{L NaOH}$ (1 M)	50	50	50	50	50	50	50	50	50
$\mu\text{L H}_2\text{O}$	20	18	16	14	12	10	8	5	0
$\mu\text{L BSA}$ (1 mg mL ⁻¹)	0	2	4	6	8	10	12	15	20
mL Bradford	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 2. Preparación de la curva de calibrado mediante el método Bradford

Los reactivos se añadieron en el orden que aparece en la tabla: (a) 50 μL de NaOH (1M) para romper la estructura cuaternaria de las proteínas y favorecer la reacción entre éstas y el reactivo Bradford; (b) agua ultrapura; (c) disolución de BSA de 1 mg mL⁻¹, estos últimos en volumen adecuado según cada caso hasta completar el mismo volumen final, (d) el reactivo de Bradford. La mezcla se agita en un vórtex para su homogeneización y se incuba a temperatura ambiente en oscuridad durante 10 minutos (La unión colorante-proteína es un proceso muy rápido y el complejo permanece estable durante un tiempo relativamente largo, aproximadamente una hora). A continuación se mide la absorbancia a 595 nm de todos los puntos frente a un blanco para obtener la curva de calibrado.

Los sobrenadantes obtenidos en el apartado anterior de glándula digestiva de cangrejo se analizan con el procedimiento descrito, utilizando 20 μL de estas diluciones, 50 μL de NaOH 1M y 1mL de reactivo Bradford. La absorbancia se mide a 595 nm. Las correspondientes concentraciones se obtienen por interpolación de éstas en la curva de calibrado.

b. Determinación de metalotioneína (MT) en glándula digestiva de cangrejo

Para las determinaciones de MT en glándula digestiva de cangrejo, el sobrenadante se calentó a 80 °C durante 10 min, se transfirió inmediatamente y se enfrió en hielo y se centrifugó adicionalmente a 30.000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se emplea como fuente para el análisis de MT. La concentración de MT se cuantifica por polarografía de pulso diferencial, como describe Bebianno y Langston (1989) [9]. La concentración de MT se expresa en mg de proteína/g citosólica MT.

c. Determinación de LPO en glándula digestiva de cangrejos

Para la determinación de la peroxidación lipídica o lipoperoxidación (LPO) en glándula digestiva de cangrejo, el método utilizado fue diseñado para evaluar el malondialdehído (MDA) y las concentraciones sobre la descomposición por peróxidos de ácidos grasos poliinsaturados 4-hidroxi-2-nonenales (4-HNE) [10]. Este procedimiento se basa en la reacción de dos moles de N-metil-2-fenilindol, un reactivo cromogénico, con un mol de MDA o 4-HNE a 45 °C durante 60 minutos, para producir un cromóforo estable que tiene una absorbancia máxima a 586 nm. Por lo tanto, a 10 µl de butilhidroxi tolueno 0,5 M (BHT) se añadieron 650 µl de una mezcla de 6 ml de metanol conteniendo 18 ml de N-metil-2-fenilindol 10,3 mM y 150 µl de ácido metanosulfónico 15,4 M con ellos se tratan 200 µl de la primera fracción citosólica obtenida del homogeneizado de la glándula digestiva de *P. clarkii* y se incubaron a 45 °C durante 60 minutos. Las concentraciones MDA + 4-HNE se estimaron mediante la medida de la absorbancia máxima del cromóforo formado a 586 nm usando bis-malondialdehído (tetrametoxipropan) (Sigma) como estándar. La peroxidación de lípidos se expresa como nmoles de MDA y 4-HNE / g de las concentraciones totales de proteínas.

2.3.4- Determinación del contenido total de metales en glándula digestiva, músculo y branquias de *Procambarus clarkii*

El procedimiento para la determinación del contenido total de metales se describe en el apartado 2.3.3 del Capítulo 1, pero analizando los tejidos criohomogeneizados. Para ello se tomó el tejido criohomogeneizado de tres organismos diferentes de cada área y se hizo un *pool* de cada órgano que se sometió a la mineralización.

2.3.5- Análisis de los extractos citosólicos mediante cromatografía de exclusión de tamaño

El procedimiento para análisis de los extractos se describe en el apartado 2.3.4 del Capítulo 1. Sin embargo, las condiciones operacionales usadas para el acoplamiento se

encuentran resumidas en la tabla 3. Los tiempos de retención correspondientes a los calibrantes de masa molecular empleados para la columna SuperdexTM-Peptide (3-70 kDa) y su curva de calibración usando las condiciones cromatográficas descritas previamente se muestra en la figura 3.

Proteínas	Masa molecular (KDa)	Tiempo de retención (min)	Metal monitorizado
Albúmina de suero bovino (BSA)	67	10,5	Cu y Zn
Metalotioneína	32	14,5	Cu y Zn
Vitamina B ₁₂	1,35	18,5	Co
Glutatión reducido	0,303	24,0	Cu, Zn y Cd
Arsenobetaina	0,179	25,9	As

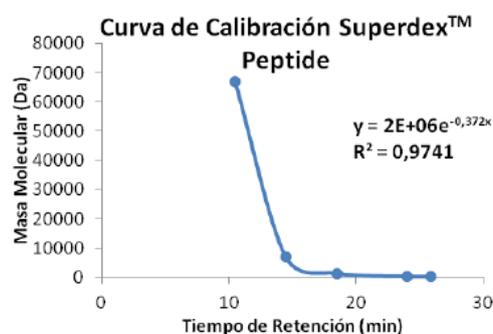


Figura 3. Tiempos de retención de los calibrantes para la columna SuperdexPeptide y su correspondiente curva de calibración.

Tras la calibración de la columna de exclusión cromatográfica se analizaron los diferentes extractos citosólicos.

2.3.4- Especiación de arsénico mediante AEC / CEC. Preparación de la muestra.

La extracción de especies de arsénico en tejido homogeneizado de cangrejo, se realizó mediante la adición de 5 ml de una mezcla de metanol/agua (1:1, v/v) a 0,100 g de muestras de tejido homogeneizado, utilizando un *pool* de cada punto de estudio. La extracción se indujo empleando una sonda ultrasónica durante 3 min a 550 W [11]. Después de cada procedimiento el extracto se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. A continuación, el sobrenadante se filtró usando un filtro de fibra de vidrio GF / C Whatman con un diámetro de 1,98 cm. El volumen total se evaporó hasta sequedad a vacío a 50°C en un evaporador rotatorio. Finalmente, se añadió 1 ml de agua ultrapura. Todos los filtros se limpiaron con 5 ml de la solución de extracción antes del uso para evitar la contaminación de las muestras.

Las medidas de As^{III}, As^V, MMA^V, DMA^V, AB, TEMA y TMAO se llevaron a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico y catiónico (AEC / CEC-ICP-MS). En general, el procesamiento o almacenamiento por congelación no altera la concentración de especies de arsénico ni los patrones.

Las condiciones operacionales usadas para el acoplamiento AEC/CEC-ICP-MS y las columnas usadas se encuentran resumidas en la tabla 3.

CAPÍTULO 2

<i>Condiciones experimentales SEC analítica, AEC y CEC</i>			
Columna	Superdex TM -Peptide (300 x 310 mm x 13 μm)		
Rango de resolución	<10 KDa		
Fase móvil	Acetato de amonio 20 mM (pH 7.4)		
Flujo	0,7 mL min ⁻¹		
Volumen de inyección	50 μL		
Visible wavelength	254 nm		
Columna	Hamilton PRP X-100 (250x 4.6 mm x 5 μm)		
Fase móvil	Bicarbonato amónico 35 mM (5% methanol) (pH 8.5)		
Flujo	1 mL min ⁻¹		
Volumen de inyección	20 μL		
Columna	Supelcosil SCX (250x 4.6 mm x 5 μm)		
Fase móvil	Piridine 20 mM (pH 2.5)		
Flujo	1,2 mL min ⁻¹		
Volumen de inyección	20 μL		
<i>Condiciones experimentales ICP-MS-ORS-MS</i>			
Foward power	1500 W	FlujoHe	3.9 mL min ⁻¹
Flujo Plasma gas	15.0 L min ⁻¹	FlujoH ₂	3.5 mL min ⁻¹
Flujo Auxiliary gas	1.0 L min ⁻¹	Q _{oct}	-18 V
Flujo Carrier gas	0.9 L min ⁻¹	Q _p	-16 V
Profundidad de muestreo	8 mm	Tiempo de análisis	0,3 por isotopo
Conossampling yskimmer	Ni	Isótopos monitorizados	Usando He como gas de colisión: ⁵⁵ Mn, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁶⁴ Zn, ⁶⁶ Zn, ⁷⁵ As, ⁵³ Cr, ⁵⁷ Fe, ⁸² Se, ¹¹⁴ Cd, ¹⁰³ Rh Usando H ₂ como gas de reacción: ⁵⁶ Fe, ⁸⁰ Se

Tabla 3. Condiciones experimentales usadas para SEC e ICP-MS.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio examina y compara la respuesta biológica de cangrejo *P. clarkii* de zonas contaminadas y no contaminadas de DNP y áreas circundantes en el suroeste de España. Los órganos que se utilizaron fueron los de mayor actividad metabólica, tales como glándula digestiva, branquias y músculo. Los organismos muestreados se usaron anteriormente en una publicación sobre el análisis integrado de metalómica y perfiles metabólicos [5], descrito en el Capítulo 3; sin embargo, para este estudio se incluyó el punto de muestreo de La Rocina (ROC).

3.1- CONCENTRACIÓN DE METALES TOTALES EN GLÁNDULA DIGESTIVA, BRANQUIAS Y MÚSCULO DE *P. CLARKII*

El análisis de contenido de metales totales en los principales tejidos de *P. clarkii* (glándula digestiva, músculo y branquias) permitió evaluar los diferentes niveles de contaminación en cada sitio de estudio. Las concentraciones de los metales más representativos (zinc, cobre, arsénico y cadmio) muestran que en general la glándula digestiva presenta los niveles más elevados de metales, seguido por las branquias y el músculo abdominal (tabla 4).

No existe una regulación legal europea o española para los niveles de Zn, Cu y As en crustáceos y productos alimenticios. Zn y Cu son metales esenciales y son fácilmente asimilados por los organismos. Sin embargo, un exceso de los mismos puede causar efectos nocivos [6, 12].

Por ejemplo en el caso del Cu; la producción minera se estimó en 307 millones de toneladas métricas hace dos décadas [13]. Una considerable cantidad de éste es aportado por los efluentes de depuradoras de lodos en industrias de acabado de metales. Los residuos orgánicos de origen industrial y agrícola entran en los ecosistemas acuáticos y el Cu pueden encontrarse en forma iónica o estar acompañado con ligandos orgánicos e inorgánicos. La bioacumulación y depuración de Cu por los diferentes tejidos en *P. Clarkii* se estudiaron previamente en ambientes contaminados [14]. Además, se observa una acumulación dependiente del tiempo de exposición a Cu en los tejidos en el orden: branquias > exoesqueleto > músculo abdominal [14].

En general, los crustáceos acumulan algunos metales (incluyendo Cu) de forma directamente proporcional al aumento de la biodisponibilidad, a partir del agua y de la cadena alimentaria [15]. Muchos crustáceos decápodos pueden regular sus tejidos corporales y las cargas de metales pesados de manera efectiva [16].

En los crustáceos, por lo general, el Zn se regula hasta que se alcanza un umbral de exposición, después de lo cual se acumulará en los tejidos a más altos niveles [17]. Esta regulación es a menudo mediada por las proteínas desintoxicantes, metalotioneínas [18]. Las

CAPÍTULO 2

metalotioneínas desempeñan un papel en el control homeostático de los metales esenciales tales como Zn y Cu [19]. Mackevičienė [20] observó que el orden de acumulación de Zn en el tejido cangrejos es: glándula digestiva > exoesqueleto > tracto digestivo > músculo abdominal.

En la mayoría de las aguas oceánicas y costeras, para el caso de Cd, las concentraciones (y por tanto su biodisponibilidad) son tan bajas que las tasa de crecimiento causa la dilución del incremento acumulado del contenido de Cd y las concentraciones en órganos disminuyen en un rango típico (a menudo bajo). De manera que el Cd acumulado se asocia generalmente con metalotioneínas y gránulos que puedan representar formas desintoxicadas [21].

La tabla 4 muestra niveles altos de contaminación en la zona de MAT, probablemente debido al derrame de residuos mineros en 1998 de la mina de Aznalcóllar [2], seguido de AJO y, en menor medida en PAR, ROC y BER. Por otro lado, los especímenes capturados en LDP, como control, presentan los niveles más bajos. Elementos como el cadmio muestran concentraciones muy bajas en todos los tejidos estudiados. Además, estos resultados están de acuerdo con los datos anteriores publicados sobre los niveles de metales totales en suelos y sedimentos recogidos en los mismos puntos de estudio, excepto en BER [22].

Tejido	Área (código)	Cu ($\mu\text{g} / \text{g}$)	Zn ($\mu\text{g} / \text{g}$)	As ($\mu\text{g} / \text{g}$)	Cd ($\mu\text{g} / \text{g}$)
Glándula digestiva	LDP	2,946 ($\pm 1,128$)	27,410 ($\pm 7,707$)	1,102 ($\pm 0,012$)	0,040 ($\pm 0,001$)
	BER	73,425 ($\pm 1,419$)	67,097 ($\pm 0,946$)	0,477 ($\pm 0,005$)	0,094 ($\pm 0,002$)
	ROC	41,723 ($\pm 0,827$)	55,692 ($\pm 2,067$)	0,360 ($\pm 0,219$)	0,191 ($\pm 0,002$)
	PAR	84,056 ($\pm 4,421$)	29,825 ($\pm 2,570$)	1,281 ($\pm 0,024$)	0,088 ($\pm 0,010$)
	AJO	156,169 ($\pm 4,541$)	52,254 ($\pm 1,702$)	1,002 ($\pm 0,022$)	0,161 ($\pm 0,002$)
	MAT	340,344 ($\pm 7,312$)	135,388 ($\pm 5,325$)	2,027 ($\pm 0,023$)	3,838 ($\pm 0,001$)
Músculo	LDP	1,414 ($\pm 1,320$)	9,506 ($\pm 2,320$)	0,111 ($\pm 0,007$)	ND
	BER	2,662 ($\pm 1,420$)	8,815 ($\pm 1,850$)	0,145 ($\pm 0,003$)	ND
	ROC	3,796 ($\pm 0,828$)	8,275 ($\pm 1,572$)	0,222 ($\pm 0,054$)	ND
	PAR	4,459 ($\pm 1,171$)	9,707 ($\pm 2,456$)	0,281 ($\pm 0,100$)	ND
	AJO	8,710 ($\pm 1,322$)	10,398 ($\pm 2,450$)	0,154 ($\pm 0,002$)	ND
	MAT	3,637 ($\pm 1,178$)	11,292 ($\pm 2,671$)	0,137 ($\pm 0,003$)	ND
Branquias	LDP	10,281 ($\pm 0,429$)	4,331 ($\pm 0,281$)	0,403 ($\pm 0,020$)	ND
	BER	27,589 ($\pm 6,814$)	6,136 ($\pm 3,121$)	0,321 ($\pm 0,066$)	ND
	ROC	23,112 ($\pm 3,523$)	5,265 ($\pm 2,685$)	0,172 ($\pm 0,021$)	ND
	PAR	46,591 ($\pm 2,640$)	5,540 ($\pm 0,877$)	0,396 ($\pm 0,088$)	ND
	AJO	39,678 ($\pm 1,949$)	4,596 ($\pm 0,481$)	0,229 ($\pm 0,011$)	ND
	MAT	29,992 ($\pm 0,693$)	23,846 ($\pm 5,605$)	2,767 ($\pm 0,809$)	0,082 ($\pm 0,026$)

ND: no detectado.

Tabla 4. Concentración de metales en tejido homogeneizado en *P. Clarkii* (media \pm SD, $\mu\text{g}/\text{g}$ peso seco) las 6 áreas de estudio [Lucio del Palacio (LDP), Bernabé (BER), Rocina (ROC), Partido (PAR), Ajolí (AJO), Matochal (MAT)].

3.2. BIOMARCADORES EN GLÁNDULA DIGESTIVA DE *P. Clarkii*. METALOTIONEÍNA Y LPO

Los resultados del contenido de proteína total determinados por el método de Bradford en el *pool* de glándula digestiva de *P. clarkii* se muestran en la tabla 5.

Tejido	n	LDP Media ± SD	MAT Media ± SD	AJO Media ± SD	BER Media ± SD	ROC Media ± SD	PAR Media ± SD
Glándula digestiva (mg g ⁻¹)	3	29,81 ± 0,08	26,72 ± 0,08	27,50 ± 0,10	39,81 ± 0,06	27,22 ± 0,03	19,81 ± 0,03

Tabla 5. Contenido de proteína total en el *pool* de glándula digestiva de *P. clarkii*

El uso de los biomarcadores bien establecidos como la metalotioneína (MT) y la peroxidación lipídica (LPO) permitió la detección de la respuesta biológica y efectos nocivos potenciales de contaminantes en *P. Clarkii*. La figura 4 muestra los resultados de estos biomarcadores determinados en *pool* de glándula digestiva de los cangrejos de las diferentes áreas muestreadas.

La síntesis de MTs fue inducida por la contaminación en la glándula digestiva de los cangrejos de río procedentes de PAR, AJO, MAT y ROC; las mayores concentraciones de esta proteína protectora corresponden a áreas con mayores niveles de metales, en particular Cu, Zn y As. Además, en la figura 5 se pueden observar cómo se alteran los perfiles de metalobiomoléculas como consecuencia de la contaminación causada por estos metales. La MT juega un papel importante en la homeostasis de metales como Cu y Zn, siendo muy importante su capacidad para contrarrestar la toxicidad vinculada a la presencia elevada de estos metales y otros de características más tóxicas como el Cd [19]. Sin embargo, en los perfiles de metalobiomoléculas de la figura 5 no se observa el pico de MT-Zn a de 7 KDa, que corresponde al patrón de esta proteína (Figura 5d), por lo que podemos concluir que la síntesis de metalotioneína se induce principalmente por la presencia de altos niveles de Cu [23].

Las alteraciones de la peroxidación lipídica (LPO) eran indicativas del deterioro oxidativo, debido a un desequilibrio entre la tasa fisiológica de la producción de oxidantes y el tiempo de respuesta de defensa antioxidante. En particular, hay un gran interés en conocer la relación entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por los contaminantes, y el daño oxidativo que se produce en proteínas, lípidos y ADN en los organismos acuáticos [24]. Entre ellos, los fosfolípidos de membrana son objetivos importantes de la acción de radicales libres, ya que son ricos en ácidos grasos insaturados, que originan la peroxidación de lípidos, lo que conduce a una pérdida de la integridad y función de la membrana y, como resultado de ello, a un daño estructural y funcional de las células, tejidos y los órganos [25]. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en estudios previos en *P. Clarkii*, que demostraron niveles de fosfolípidos totales consistentes con esta lesión oxidativa, así como con el aumento de productos de degradación de fosfatidilcolinas, como la colina y la fosfocolina, que se encuentran en la mayoría de los fosfolípidos [5]. Por otro lado, aunque en el presente estudio se encontraron los mayores niveles de LPO en organismos que tienen como

CAPÍTULO 2

hábitat los campos de arroz, MAT, otros puntos de muestreo muestran niveles similares de LPO, como es el caso de LDP y BER; que también muestran niveles similares de la enzima antioxidante (MT).

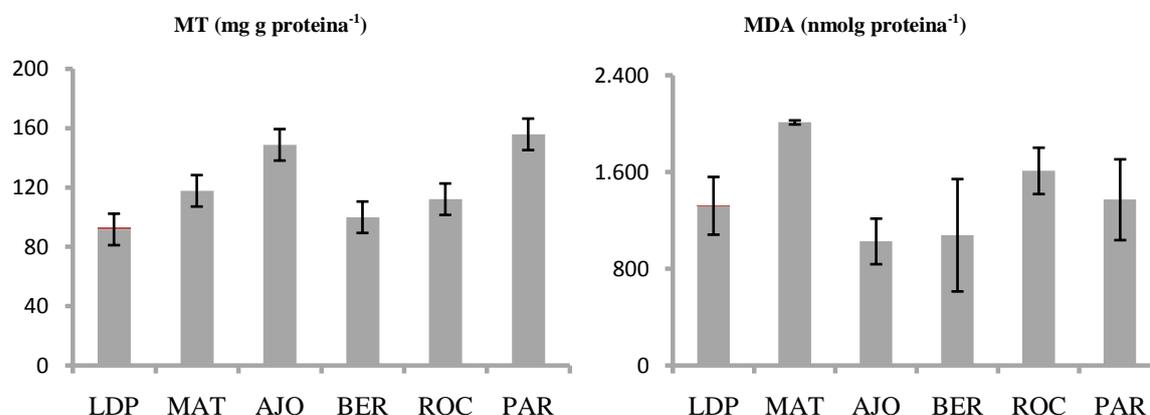


Figura 4. Concentraciones de MT (mg g proteína⁻¹) y MDA (nmol g proteína⁻¹) en glándula digestiva de cangrejos *P. Clarkii* en las 6 áreas de estudio (Lucio del Palacio (LDP), Matochal (MAT), Ajolí (AJO), Bernabé (BER), Rocina(ROC), Partido (PAR)).

3.3. PERFILES DE BIOMOLÉCULAS UNIDAS A Cu, Zn Y As EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE GLÁNDULA DIGESTIVA, MÚSCULO Y BRANQUIAS DE *P. Clarkii*

La bioacumulación y el impacto de los metales pesados como Cu, Zn y As en el cangrejo de río se ha considerado en detalle en la literatura [26]. Ejemplos de metales traza esenciales son el Cu, Zn y Fe. Estos elementos son los componentes vitales de las enzimas y pigmentos respiratorios. La anhidrasa carbónica, carboxi-peptidasa A y B y varios deshidrogenasas contienen Zn; la piruvato carboxilasa contiene Mn, la hemocianina contiene Cu y la hemoglobina contiene Fe [27]. En consecuencia, estos metales traza deben estar en cantidades suficientes para satisfacer las necesidades metabólicas y respiratorias [28]. Por esa razón se encuentran niveles relativamente altos de Cu en tejidos de cangrejos de río, especialmente en glándula digestiva [29-31]. Sin embargo, cuando el Cu está en exceso, es tóxico, cuando esto suceda, las metalotioneínas pueden jugar un papel importante en la homeostasis de Cu y la desintoxicación [23]. Los efectos tóxicos del Zn también se han reportado en branquias en invertebrados, así como la inducción de enzimas antioxidantes [23]. Por lo tanto, el mecanismo de toxicidad y la distribución de los tóxicos son importantes para explicar la presencia relativa de metalobiomoléculas en los diferentes órganos de los organismos expuestos.

Para comprobar la presencia e interacciones potenciales de biomoléculas unidas a metales en los distintos órganos de *P. clarkii* de las áreas bajo estudio, se consideraron los cambios en los perfiles de metalobiomoléculas causados por los distintos metales, que fueron rastreados mediante la aplicación del acoplamiento SEC-ICP-MS a los extractos citosólicos de la glándula digestiva, músculo y branquias de cangrejos. Los resultados más interesantes se observaron en relación a Zn, Cu, y Cd, como elemento tóxico. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.

Estos cromatogramas muestran diferencias en la expresión metaloproteínas en función del metal considerado. Puede destacarse la alta intensidad de los picos trazados por Cu a un tiempo de retención aproximado de 7 kDa en el extracto citosólico de glándula digestiva, que coincide bien con metalotioneína I estándar (figura 5a). La intensidad del pico de Cu de la zona contaminada MAT (figura 5a) es claramente superior a la de otros sitios también afectados por la contaminación, tales como AJO, PAR y ROC (que representan una reducción de aproximadamente el 40-50% de la intensidad del pico respecto a MAT) y el LDP y BER (reducción del 90% respecto de la intensidad pico de MAT), que de hecho puede estar relacionado con la concentración correlativa de este elemento en los tejidos *P. clarkii* (tabla 4). El pico equivalente, al mismo tiempo de retención, trazado por As (figura 5g) presenta muy baja sensibilidad, aunque la mayor señal se observa en muestras de MAT asociado a la mayor concentración de As en las glándulas digestivas de especímenes muestreados en esta zona (tabla 4).

La señal trazada por Zn (figura 5d) asociada a MAT presenta un tiempo de retención asociado a patrones de 307 Da, que puede relacionarse con la presencia de glutatión reducido que se sobreexpresa en la glándula digestiva como consecuencia de la contaminación en MAT [32].

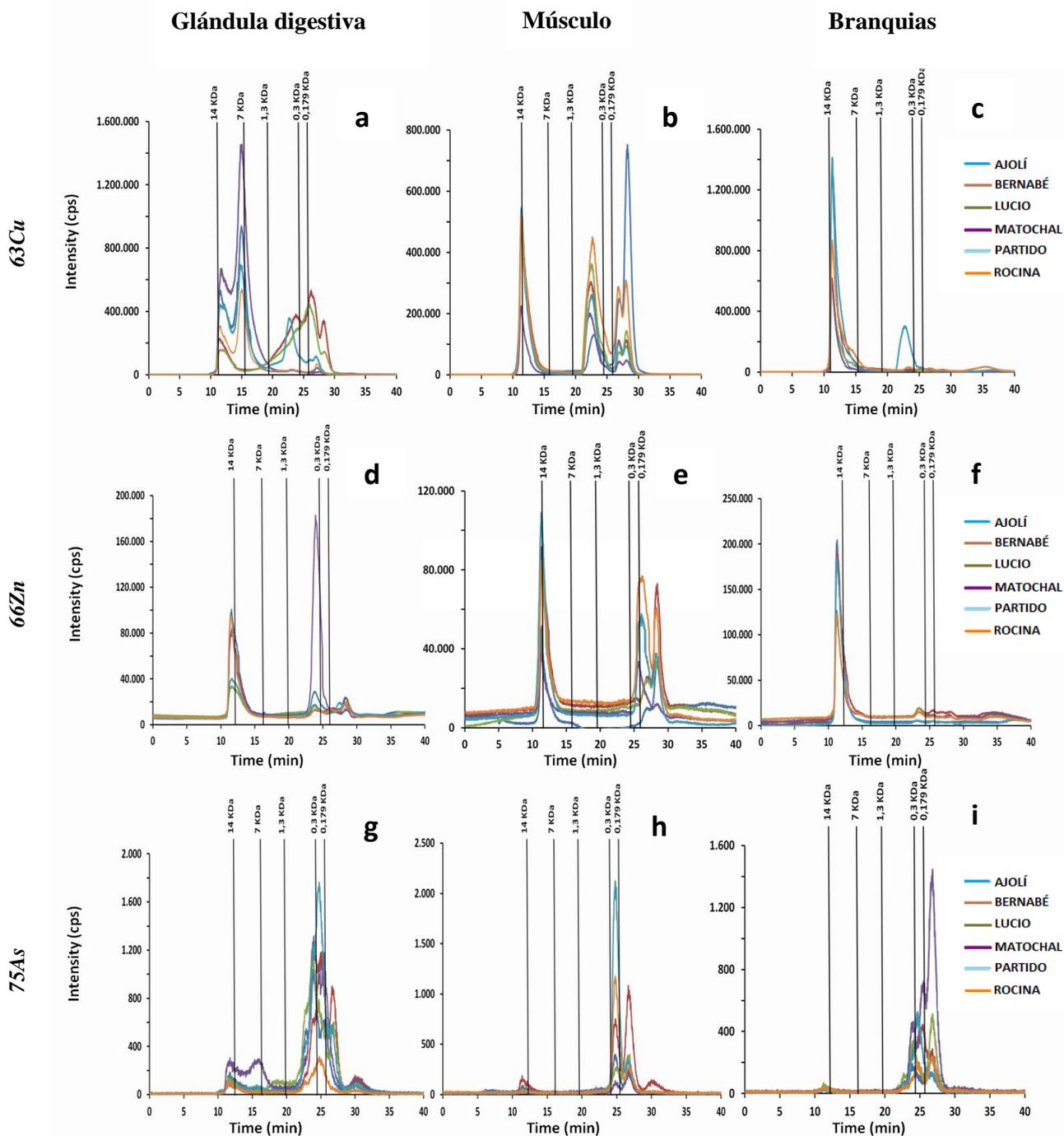


Figura 5.Perfiles de biomoléculas unidas a Zn, Cu y As en extractos citosólicos de glándula digestiva (a, d, g), músculo (b, e, h) y branquias (c, f, i) de *P. Clarkii* en las diferentes áreas de muestreo determinados por SEC-ICP-MS.

3.4. ESPECIACIÓN DE As EN GLÁNDULA DIGESTIVA DE *P. Clarkii* EN ÁREAS CONTAMINADAS Y NO CONTAMINADAS

Debido a que la confirmación de metabolitos específicos arsénico no es posible con sólo una separación SEC, se aplicó un otra separación cromatográfica por intercambio iónico (IEC), complementaria con lo anterior, para la purificación adicional de las moléculas que contienen arsénico. Por lo tanto, la presencia de metabolitos de bajo peso molecular de especies de As en extractos citosólicos analizadas por SEC-ICP-MS en la glándula digestiva de *P. clarkii* (figura 5g) requiere la especiación de arsénico en las muestras del área contaminada (MAT) y no contaminada (LDP). La concentración más elevada de As en las glándulas digestivas de especímenes de MAT (tabla 4), por lo que este punto de muestreo fue elegido para el análisis.

Las figuras 6a y 6b muestran cromatogramas típicos de una solución que contiene 200 µg/L de estándares de As obtenidos por cromatografía de intercambio aniónico (HPLC-(AEC)-ICP-MS) y cromatografía de intercambio catiónico (HPLC-(CEC)-ICP-MS), respectivamente, y la figura 7, los cromatogramas obtenidos en *P. clarkii* del LDP (figura 7a y 7c) y MAT (figura 7b y 7d) utilizando la misma metodología analítica. En estas muestras; As^{III}, As^V, AsB, DMA, MMA, TEMA y TMAO fueron claramente identificados según el tiempo de retención relacionados con los estándares usados por HPLC-(IEC) -ICP-MS.

El cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio de aniones mostró que los arsenicales inorgánicos (As^{III} y As^V) son las especies predominantes en la glándula digestiva de las zonas contaminadas y no contaminadas (figura 7a y 7b, respectivamente), mientras que la arsenobetaína, a diferencia de lo que ocurre con otros organismos de origen marino, no era la principal especie de arsénico. Los resultados obtenidos están de acuerdo con trabajos previos llevados a cabo en la misma zona de muestreo [7-8], lo que sugiere que la composición arsenical en la glándula digestiva de *P. clarkii* el 50% aproximadamente arsénico se encuentra en forma inorgánica.

Los arsenicales metilados (MMA y DMA) especies también importantes en la en la glándula digestiva, pero además pueden observarse dos picos que no coinciden con ninguna de los estándares disponibles, los cuales se eluyeron inmediatamente antes y después de la MMA (flecha azul de la figura 7).

La utilización de la cromatografía de intercambio catiónico permitió la separación de las especies tri-metiladas (TMA y TMAO), sin embargo, estas especies se encuentran en muy baja concentración en todas las muestras analizadas. Además, muestran un pico desconocido que aparece con un tiempo de retención de 55 seg (flecha roja de la figura 7) que puede estar

CAPÍTULO 2

relacionado con la presencia de arsenocolina, de acuerdo con el tiempo de retención analizado con la misma columna y condiciones por Chatterjee (2.000) [33]

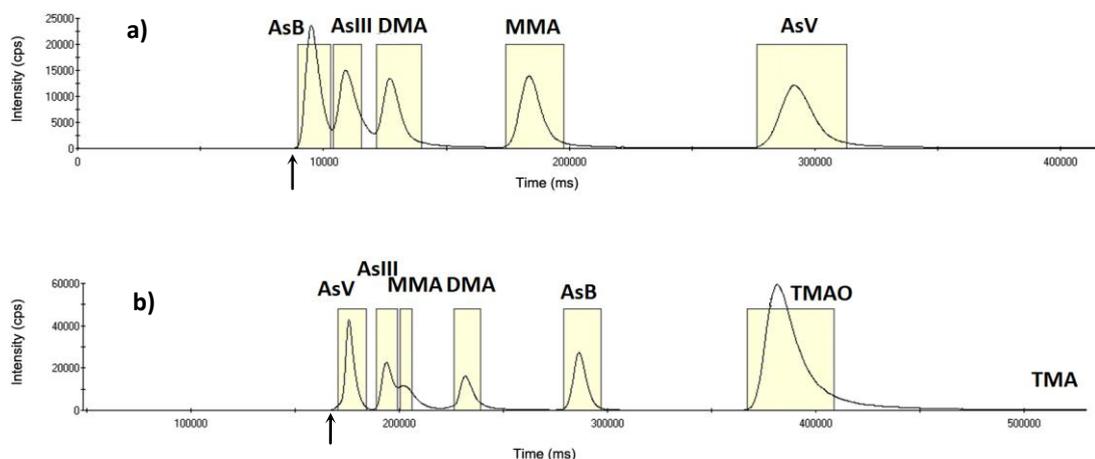


Figura 6. Cromatograma(a): CromatogramaHPLC-(AEC)-ICP-MS de los estándares de As a200 $\mu\text{g/L}$ cada uno (como As). (b): Cromatograma HPLC-(CEC)-ICP-MS de los estándares de As a 200 $\mu\text{g/L}$ cada uno (como As). La flecha negra indica el volumen muerto de la columna cromatográfica.

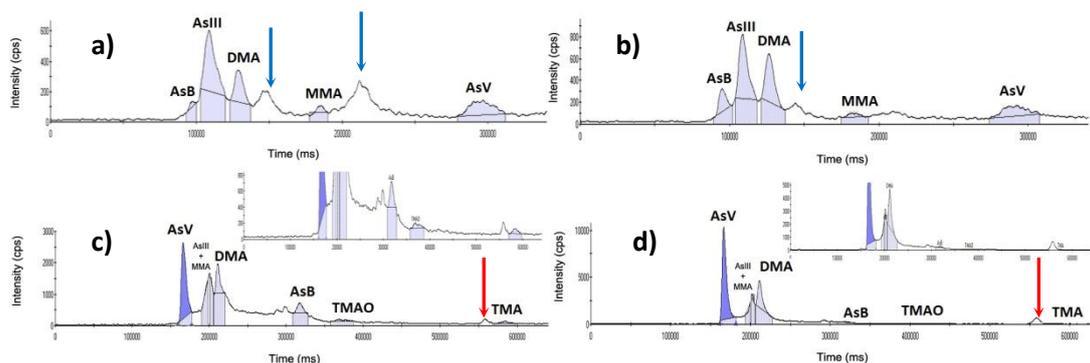


Figura 7. Cromatogramas obtenidos de un *pool* de glándula digestiva del cangrejo *P. clarkii* en LDP (a, c) y MAT (b, d) usando HPLC-(AEC)-ICP-MS (LDP, a y MAT, b) y HPLC-(CEC)-ICP-MS (LDP, c y MAT, d). Las condiciones operacionales de HPLC-ICP-ORC-MS se indican en la tabla 3. Las inserciones de (c) y (d), representan los mismos cromatogramas magnificados.

IV. CONCLUSIONES

Los resultados más interesantes en los niveles de metales en órganos de *P. Clarkii* se observaron para Zn, Cu, As y Cd, con una mayor presencia de estos metales en la glándula digestiva, seguido por las branquias y el músculo abdominal. Los niveles más altos de contaminación se encontraron en la zona de MAT, probablemente debido al vertido de residuos mineros en 1998 de la mina de Aznalcóllar, seguido de AJO y, en menor proporción en PAR, ROC y BER. Por otro lado, los especímenes capturados en LDP, usado como control, presentan los niveles más bajos. Los niveles de Zn y Cu en glándula digestiva de especímenes de MAT difieren en uno y dos órdenes de magnitud en relación a LDP, respectivamente. Y en el caso del Cd, sólo se ha detectado la presencia de este elemento en la glándula digestiva, puesto que éste es el órgano principal de acumulación y detoxificación de Cd en cangrejos.

Los perfiles de metalobiomoléculas de Cu, Zn y As en los distintos órganos no muestran grandes similitudes. Son destacables los picos trazados por Cu en las glándulas digestivas, con tiempos de detección coincidentes con el patrón de MT, comprobándose que la intensidad de este pico es mayor en MAT que en el resto de zonas estudiadas. Este hecho puede estar relacionado con la concentración de este elemento en los tejidos el *P. clarkii*. El pico equivalente, al mismo tiempo de retención trazado por As-biomoléculas muestra menos sensibilidad, pero es relevante en el caso de MAT, que exhibe la intensidad más alta, que indica la presencia de moléculas As-MT.

En el caso de Zn-biomoléculas la señal correspondiente a MAT, que coincide con el tiempo de retención de 307 Da, se puede relacionar con la presencia de glutatión reducido expresado en la glándula digestiva, con una intensidad menor en el resto de puntos de muestreo.

Las alteraciones de la peroxidación lipídica (LPO) en la glándula digestiva de los cangrejos de río son indicativas de deterioro oxidativo debido a un desequilibrio entre la tasa fisiológica de la producción de oxidantes y el tiempo de respuesta de defensa antioxidante. Otro biomarcador que señala procesos de deterioro oxidativo es la metalotioneína que se sobreexpresa en las zonas contaminadas.

Por otra parte, en los resultados de la especiación de arsénico, los arsenicales inorgánicos (As^{III} y As^{V}) son las especies predominantes en la glándula digestiva. Los resultados sugieren que entre los puntos de muestreo estudiados, MAT es el sitio más contaminado, en el que también se ha encontrado una metalotioneína unida a As (As-MT). Además se han encontrado picos desconocidos en el área más contaminada y no contaminada, de los cuáles, uno de ellos coincide con los tiempos de retención de la arsenocolina bajo las mismas condiciones cromatográficas.

CAPÍTULO 2

En la industria alimentaria, cangrejo de río se limpia normalmente antes de ser procesado, y posteriormente el consumidor retira la cubierta externa después de la cocción y consume el músculo y, en menor medida, la glándula digestiva y parte de la cabeza. Con el fin de hacer una evaluación toxicológica más fiable, sería recomendable realizar estudios de especiación de las diversas partes comestibles de cangrejos de río, tanto en estado natural después de su transformación industrial.

V. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Habsburgo-Lorena AS. Present situation of exotic species of crayfish introduced into Spanish continental waters. *Freshwater Crayfish*. 1979; 5:175–184.
- [2] Grimalt JO, Ferrer M, Macpherson E. The mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci Total Environ*. 1999; 242(1–3):3–11.
- [3] Vioque-Fernández A, Alves de Almeida E, López-Barea J. Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii* integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Sci Total Environ*. 2009; 407(5):1784–1797.
- [4] Vioque-Fernández A, de Almeida EA, Ballesteros J, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL, López-Barea J. Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicol Lett*. 2007; 168(3):260–268.
- [5] Gago-Tinoco A, González-Domínguez R, García-Barrera T, Blasco-Moreno J, Bebianno MJ, Gómez-Ariza JL. Metabolic signatures associated with environmental pollution by metals in Doñana National Park using *P. clarkii* as bioindicator. *Environ Sci Pollut Res Intern*. 2014; 21(23):13315-23.
- [6] Anderson MB, Reddy P, Preslan JE, Fingerman M, Bollinger J, Jolibois L, George WJ. Metal accumulation in crayfish, *Procambarus clarkii*, exposed to a petroleum-contaminated Bayou in Louisiana. *Ecotoxicol Environmental Safe*. 1997; 37(3):267–272.
- [7] Devesa V, Suñer MA, Lai VWM, Granchinho SCR, Martínez JM, Vélez D, et al. Determination of arsenic species in a freshwater crustacean *Procambarus clarkii*. *Appl Organometal Chem*. 2002; 16(3):123–132.
- [8] Devesa V, Suñer MA, Lai VWM, Granchinho SCR, Vélez D, Cullen WR, Montoro R. () Distribution of arsenic species in the freshwater crustacean *Procambarus clarkii*. *Appl Organometal Chem*. 2002; 16(12):692–700.
- [9] Bebianno MJ, Langston WJ. Quantification of metallothioneins in marine invertebrates using differential pulse polarography. *Portugaliae Electrochimica Acta*. 1989; 7:511-524.
- [10] Gérald-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-henry N, Yadan J, Chaudie J. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. 1998; 1176–1183.
- [11] Contreras-Acuña M, García-Barrera T, García-Sevillano Ma, Gómez-Ariza JL. Speciation of arsenic in marine food (*Anemonia sulcata*) by liquid chromatography coupled to inductively

CAPÍTULO 2

coupled plasma mass spectrometry and organic mass spectrometry. *J Chromatography*. 2013; 1282:133-41.

[12] Schmitt CJ, Brumbaugh WG, Linder GL, Hinck JE. A screening-level assessment of lead, cadmium and zinc in fish and crayfish from Northeastern Oklahoma, USA. *Environ Geochem Health*. 2006; 28:445-471.

[13] Nriagu JO. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. *Nature*. 1979a; 279:191-204.

[14] Naqvi SM, Devalraju I, Naqvi NH. Copper bioaccumulation and depuration by red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1998; 61(1):65-71.

[15] Rainbow PS, Phillips DJH, Depledge MH. The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. A need for laboratory investigation of accumulation strategies. *Mar Pollut Bull*. 1990; 21:321-324.

[16] Rainbow S, White SL. Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, Cu, and cadmium in decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia*. 1989; 174:245-262.

[17] Vijayram K, Geraldine P. Are the heavy metals cadmium and zinc regulated in freshwater prawns? *Ecotoxicol Environ Saf*. 1996; 34:180-183.

[18] Rainbow PS. Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Estuar Coast Shelf Sci*. 1997, 44:169-175.

[19] Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol*. 2006; 76:160-202.

[20] Mackevičienė G. Bioaccumulation of heavy metals in noble crayfish (*Astacus astacus L.*) tissues under aquaculture conditions. *Ekologia (Vilnius)*. 2002, 79-82.

[21] Strategies, A. The Significance of Trace Metal Concentrations in Marine Invertebrates A Need for Laboratory Investigation of Accumulation Strategies. *Mar Pollut Bull*. 1990; 2(7):321-324.

[22] García-Sevillano Ma, GonzálezFernández M, Jara-Biedma R, García-Barrera T, López-Barea J, Pueyo C, et al. Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem*. 2012; 404(6-7):1967-81.

- [23] Geret F, Serafim A, Barreira L, Bebianno MJ. Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Mar Environ Res.* 2002; 54(3-5):413–417.
- [24] Livingstone DR. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull.* 2001; 42:656–666.
- [25] Winston GW, Di Giulio RT. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol.* 1991; 19:137–161.
- [26] Kouba A, Buřič M, Kozák P. Bioaccumulation and Effects of Heavy Metals in Crayfish: A Review. *Water, Air, & Soil Pollution.* 2009; 211(1-4):5–16.
- [27] White, SL, Rainbow, PS () On the metabolic requirements for copper and zinc in molluscs and crustaceans. *Mar Environ Res.* 1985; 16(3):215–229.
- [28] Depledge MH, Rainbow PS. Mini-review models of regulation and accumulation trace metals in marine invertebrates. *J Environ Biol.* 1990; 97(1):1–7.
- [29] Bagatto G, Alikhan MA. Copper, cadmium, and nickel accumulation in crayfish populations near copper-nickels melters at Sudbury, Ontario, Canada. 1987a; 38(3):540-545.
- [30] Madden JD, Grodner RM, Feagley SE, Finerty MW, Andrews LS. Minerals and xenobiotic residues in the edible tissues of wild and pond-raised Louisiana crayfish. *J Food Saf.* 1991; 11:1–15.
- [31] Bruno G, Volpe MG, De Luise G, Paolucci M. Detection of heavy metals in farmed *Cherax destructor*. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture.* 2006; 380–381:1341-1349.
- [32] Liao VHC, Yu CW. *Caenorhabditis elegans* gcs-1 confers resistance to arsenic-induced oxidative stress. *BioMetals.* 2005; 18(5):519–528.
- [33] Amit C. Determination of total cationic and total anionic arsenic species in oyster tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC–ICP-MS. *Talanta.* 2000; 51:303-314.

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Puntos de muestreo y principales fuentes de contaminación.

Figura 2. Nasa para cangrejos.

Figura 3. Tiempos de retención de los calibrantes para la columna SuperdexPeptide y su correspondiente curva de calibración.

Figura 4. Concentraciones de MT ($\text{mg g proteína}^{-1}$) y MDA ($\text{nmol g proteína}^{-1}$) en glándula digestiva de cangrejos *P. Clarkii* en las 6 áreas de estudio.

Figura 5. Perfiles de biomoléculas unidas a Zn, Cu y As en extractos citosólicos de glándula digestiva, músculo, y branquias de *P. Clarkii* en las diferentes áreas de muestreo determinados por SEC-ICP-MS.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas UTM de las zonas de muestreo estudiadas y datos morfométricos de los cangrejos *Procambarus clarkii* capturados en éstas.

Tabla 2. Preparación de la curva de calibrado mediante el método Bradford.

Tabla 3. Condiciones experimentales usadas para SEC e ICP-MS.

Tabla 4. Concentración de metales en tejido homogeneizado en *P. Clarkii* (media \pm SD, $\mu\text{g/g}$ peso seco) las 6 áreas de estudio.

Tabla 5. Contenido de proteína total en el *pool* de glándula digestiva de *P. clarkii*.

**CAPÍTULO 3: Búsqueda de biomarcadores
metabolómicos de estrés medioambiental en el
cangrejo *Procambarus clarkii***

I. ANTECEDENTES

Con objeto de disponer de una herramienta segura que nos permita realizar una diagnosis inequívoca de la situación ambiental de la zona en estudio, que permita complementar los resultados metalómicos y de especiación obtenidos en los Capítulos 1 y 2 en *S. plana* y *P. Clarkii*, el presente capítulo abordará un enfoque metabolómico de las zonas en estudio utilizando como bioindicador el cangrejo *P. Clarkii*. El objetivo principal del estudio es disponer de biomarcadores metabolómicos relacionados con la respuesta al estrés ambiental y su posible aplicación a la diagnosis de problemas ambientales.

Los resultados obtenidos se recogen en la publicación:

“Metabolic signatures associated with environmental pollution by metals in Doñana National Park using P. clarkii as bioindicator”. A. Gago-Tinoco, R. González-Domínguez, J. Blasco-Moreno, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza. ***Environ. Sci. Pollut. Res.*** (2013) 21:13315-13323.

II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

Para la preparación de muestras se usó una centrífuga modelo MiniSpin[®] (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), y en la caracterización de los metabolitos presentes en los extractos obtenidos a partir de los extractos de *P. clarkii* el espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo - tiempo de vuelo modelo QSTAR XL Hybridsystem (AppliedBiosystem, Foster City, CA, USA), equipado con fuente de ionización electrospray (ESI).

2.2. REACTIVOS

Metanol y cloroformo (HPLC-grade) fueron adquiridos de Fisher Scientific (Leicestershire, UK), mientras que el acetato de amonio y ácido fórmico fueron suministrados por Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). El agua se purificó con un sistema de gradiente Milli-Q (Millipore, Watford, UK).

2.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

2.3.1. Zonas de muestreo de moluscos cangrejos (*Procambarus clarkii*)

Las muestras han sido capturadas durante la primavera del 2009 en los 5 puntos de muestreo ya citados en el Capítulo 2: “Lucio del Palacio” (LDP) (control) y 4 zonas situadas en el entorno del Parque: El Partido (PAR), Bernabé (BER), El Ajolí (AJO) y El Matochal (MAT).

2.3.2. Manipulación de los animales de experimentación

El protocolo de muestreo de los especímenes es el descrito en el Capítulo 2; sin embargo, los cangrejos fueron diseccionados de manera más exhaustiva para obtener tejidos de glándula digestiva, músculo abdominal, branquias y glándula antenal, que no ha sido considerada anteriormente.

2.3.3. Análisis metabolómico y quimiométrico

El análisis metabolómico y quimiométrico se llevó a cabo en glándulas digestivas, músculo abdominal, branquias y glándula antenal del cangrejo *P.clarkii*.

Se ha utilizado un procedimiento de extracción en dos pasos para para la separación exhaustiva de los metabolitos que se muestra en la figura 1 [1].

La extracción se llevó a cabo en los distintos órganos (glándula digestiva, branquias, músculo abdominal y glándula antenal) de *P. clarkii*, utilizando tres individuos de cada punto de muestreo. Los órganos se desagregan con un homogeneizador criogénico como se describe en el Capítulo 1, apartado 3.3.2 y se extraen secuencialmente para aislar polares y apolares. En un

primer paso, los tejidos se homogenizan con una mezcla acuosa de metanol (80%); y a continuación, los metabolitos menos polares se extraen del pellet con una mezcla cloroformo:metanol (2:1).

Para el análisis de los extractos polares se le añade fórmico (0,1%) a la muestra y para el de extractos apolares acetato de amonio (10 mM en MeOH). El análisis metabolómico se ha llevado a cabo mediante infusión directa en un espectrómetro de masas de alta resolución con fuente electrospray.

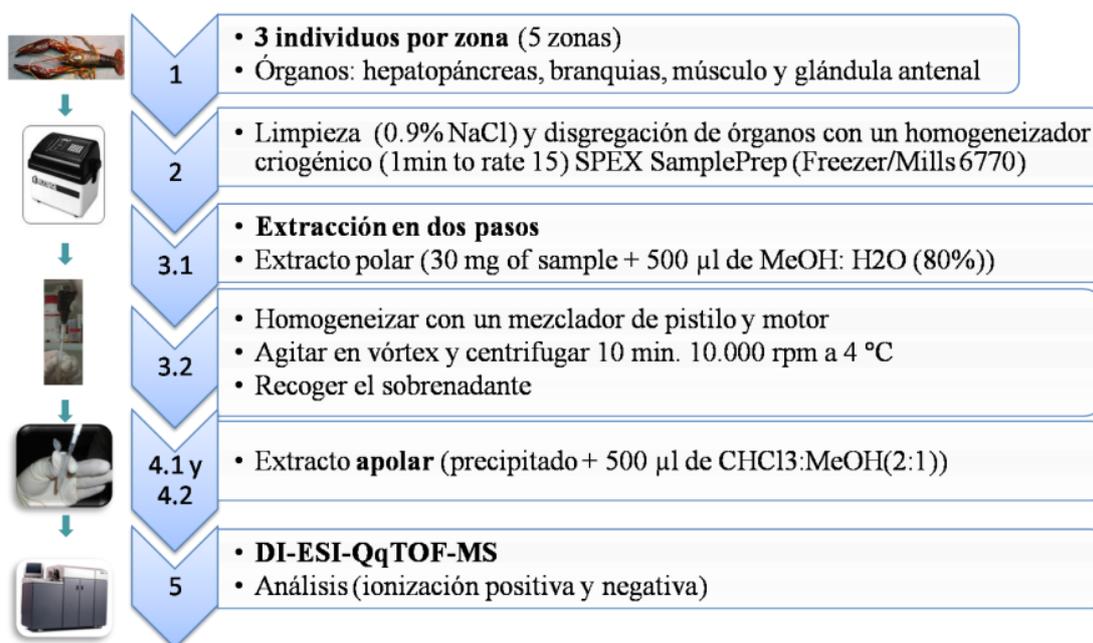


Figura 1. Procedimiento experimental de muestras para análisis metabolómico [1]

Para el análisis metabolómico por espectrometría de masas por infusión directa (DIMS), usando una fuente electrospray (ESI), el método se optimizó previamente como se ha descrito previamente [2].

Las muestras se introdujeron en el espectrómetro de masas con un flujo de $5 \mu\text{l min}^{-1}$ utilizando un aparato integrado con una bomba de jeringa y una jeringa Hamilton de un volumen de 1000 µl. Los datos se obtuvieron tanto en modo de ionización positivo como negativo adquiriendo una media de espectros full-scan de 0,2 minutos en el rango de m/z de 50-1.100 con 1,005 s de scan time. En el modo positivo o ESI (+), el voltaje ion spray (IS) se fijó en 3.300 V, y se usó nitrógeno de alta pureza como curtain y nebulizer gas con unos caudales de aproximadamente 1,13 y 1,56 L min^{-1} , respectivamente. La temperatura de la fuente se fijó en 60 °C, con un declustering potential (DP) de 60 V y un focusing potential (FP) de 250 V. Para ESI (-), solamente se modificaron algunos parámetros con respecto al método ESI (+),

que son el voltaje de ion spray a-4000 V, DP de -100 V, y FP de -250 V. Para la adquisición del espectro de masas en tándem (MS / MS), se usó el nitrógeno como gas de colisión.

2.3.4. Análisis de datos metabolómicos

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el software Markerview™ (Applied Biosystems) para preprocesar los resultados de espectrometría de masas y para llevar a cabo la reducción en una matriz de bidimensional de datos conteniendo las relaciones m/z de los picos y sus intensidades.

La búsqueda de pico se realizó con una tolerancia de masa de 0,1 Da, y se consideró un mínimo de respuesta del 10 cuentas para el filtrado. Además, los datos se normalizaron teniendo en cuenta la suma total de áreas, y se sometieron a un escalado Pareto para reducir la importancia relativa de los valores elevados, así como a una transformación logarítmica con objeto de aproximarlos a una distribución normal. Se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para clasificar las muestras según su procedencia, empleando para ello el software SIMCA-P™ (versión 11.5, Umetrics AB, Umeå, Suecia). La calidad de los modelos PLS-DA se evaluó por su separación de clases (R^2) y valores predictivos de potencia (Q^2), que son indicativos de la bondad del ajuste y bondad de la predicción, respectivamente. Además, estos modelos fueron validados mediante pruebas de permutación (*Y-scrambling*) de los valores Y-previstos. En *Y-scrambling*, las etiquetas de clase son permutadas al azar para volver a montar un nuevo modelo con el mismo número de componentes que el original, y luego estos nuevos modelos se comparan con los modelos originales para evaluar la posibilidad de que el modelo original se generara por casualidad. Por tanto, un modelo ajustado tendrá R^2 y Q^2 similares a los de los datos permutados al azar, aunque los modelos bien ajustados y significativos tendrán valores R^2 y Q^2 que son siempre más altos que los modelos de datos permutados.

Por último, los posibles biomarcadores de contaminación ambiental se seleccionaron de acuerdo a la variable de importancia en la proyección o VIP (una suma ponderada de cuadrados del peso de los PLS, lo que indica la importancia de la variable en el modelo), considerando sólo las variables con valores VIP superiores a 2, indicativos de diferencias significativas entre los grupos. Estos metabolitos se identificaron mediante la búsqueda de la masa exacta experimental y experiencias MS/MS, con los espectros disponibles en bases de datos de acceso abierto, como el METLIN (<http://metlin.scripps.edu>) o el banco de masas (<http://www.massbank.jp>).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR METALES

Para comparar los perfiles trazados por metales se considera el contenido de metales totales en los principales tejidos de *P. clarkii* (glándula digestiva, musculo, y branquias), que permitió evaluar los diferentes niveles de la contaminación en cada sitio de estudio, como se describió en el Capítulo 2. Estos resultados mostraron contaminación importante en MAT, probablemente debido al vertido de residuos mineros en 1998 de la mina de Aznalcóllar [3], seguido de AJO y, en menor medida, las áreas BER y PAR. Por otra parte, los especímenes capturados en LDP, debido a su carácter de control no contaminado, presentan los niveles más bajos de metales. Además, estos resultados están de acuerdo con los datos anteriores publicados sobre niveles de metales totales en suelos y sedimentos estudiados en los mismos puntos en estudio [4]

3.2. COMPARACIÓN DE LOS PERFILES METABOLÓMICOS

El enfoque metabolómico basado en espectrometría de masas por infusión directa (ESI-QqTOF-MS); junto con el uso de metodologías analíticas complementarias que combinan dos pasos de extracción de metabolitos, polares y lipofílicos, y utilizando modos de ionización positiva y negativa (ESI (+) / ESI (-)), permite obtener perfiles metabólicos completos para los distintos tejidos de cangrejo. Además, el estudio de glándula digestiva, músculo, branquias y glándula antenal, proporciona una visión general de las diferencias bioquímicas entre los tipos de tejidos.

Usando la intensidad de los picos m/z en espectros de masas ESI full-scan como descriptores químicos, se aplica un PLS-DA para establecer si se obtenían grupos definidos entre puntos de muestreo diferentes. Para ello, se construyó un modelo estadístico con cada lote de datos, teniendo en cuenta el análisis en los modos positivos y negativos de los extractos polares y lipofílicos de los cuatro tejidos estudiados, que determina un total de 16 análisis discriminantes. La figura 2 muestra la representación de los *score plots* de uno de estos modelos en los que los extractos polares de glándulas digestivas ($n = 3$), analizados en el modo de ionización positivo, se clasifican en función de su procedencia. Como se puede observar, las muestras se clasifican en diferentes grupos de puntos, pero la separación entre los grupos no es perfecta, ya que se producen solapamientos entre varios de ellos. Sin embargo, el área no contaminada (LDP) estaba claramente clasificada en un cluster de puntos con respecto a las muestras de sitios que presentaban algún tipo de contaminación.

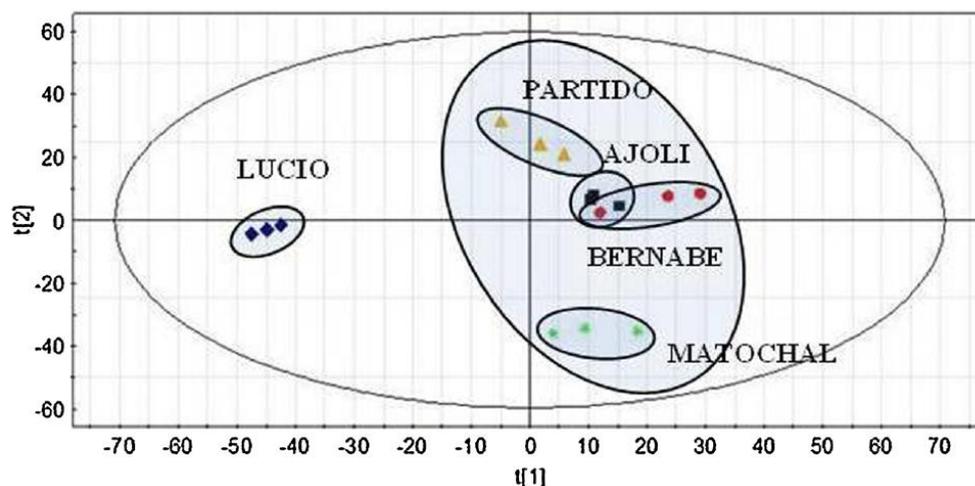


Figura 2. Scores plots de PLS -DA teniendo en cuenta extractos polares de glándulas digestivas de *P. Clarkii* en 5 puntos de muestreo. LDP (azul), PAR (naranja), BER (rojo), AJO (negro) y MAT (verde).

Esas diferencias metabólicas podrían atribuirse a los efectos de la contaminación, considerando LPD como punto de control. En un segundo tratamiento de datos, estos se reprocesaron considerando sólo dos grupos de estudio: el zona de referencia (LDP) y las restantes zonas con contaminación diferencial (MAT,AJO, PAR y BER). Los *Score plots* de éstos análisis estadísticos muestran una separación completa entre los dos casos considerados (figura 3).

En total, se calculan cuatro componentes latentes para producir las mejores capacidades de predicción de modelos en términos de valores de R^2 y Q^2 (tabla 1). Como se puede observar, los modelos proporcionaron una buena clasificación con respecto a los valores de separación de clases y su alto poder predictivo utilizando sólo cuatro modelos de componentes (tabla 1).

	Glándula digestiva	Branquias		Músculo		Glándula antenal			
		R^2	Q^2	R^2	Q^2	R^2	Q^2		
ESI+	Extracto polar	1	0,882	0,996	0,621	0,994	0,856	0,999	0,862
	Extracto lipofílico	0,99	0,90	0,994	0,322	0,998	0,831	1	0,875
ESI-	Extracto polar	1	0,927	0,989	0,567	0,999	0,866	0,997	0,858
	Extracto lipofílico	1	0,941	1	0,814	1	0,903	1	0,892

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los modelos PLS-DA.

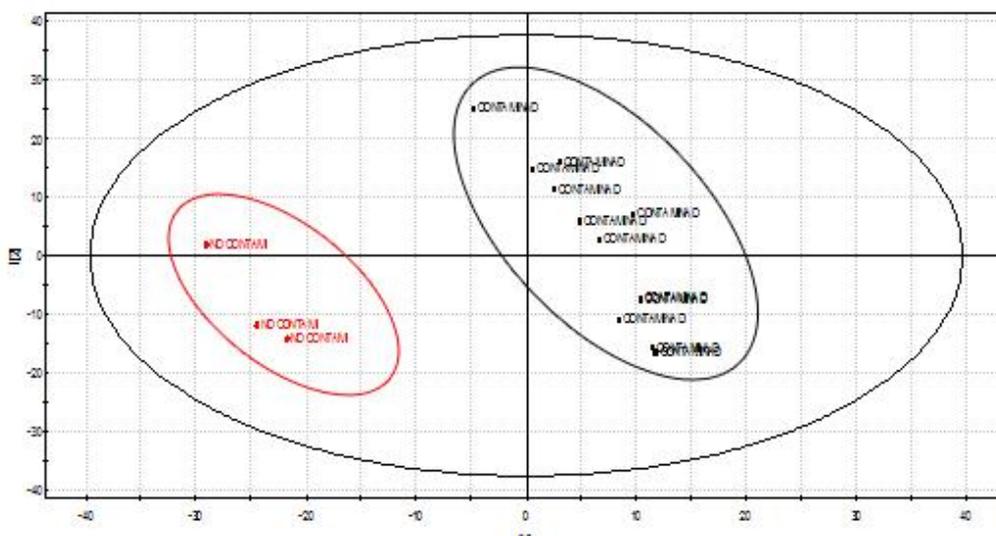


Figura 3. Scores plots de PLS -DA teniendo en cuenta LDP (rojo) frente al resto de puntos de muestreo (negro) en extractos de glándulas digestivas de *P. Clarkii*.

Por último, se identifica un número considerable de metabolitos como biomarcadores potenciales de contaminación ambiental usando la variable de importancia en la proyección (VIP), como se explica en la parte experimental. Así, las señales más importantes en la discriminación se identificaron con la ayuda de bases de datos metabolómicas (tabla 2). La mayoría de los marcadores importantes se relacionan con niveles disminuidos de carnosina, alanina, niacinamida, acetoacetato, ácido pantoténico, ascorbato, glucosa-6-fosfato, arginina, glucosa, lactato, y aumento en los niveles de acetil carnitina, fosfocolina, colina, y ácido úrico. Por otra parte, además de estos compuestos individuales, se aprecian algunas señales en los intervalos m/z de 650 hasta 850 y 850 a 900, que pueden ser asignadas a los fosfolípidos (PLS) y triglicéridos (TGS), respectivamente, se redujo considerablemente en muestras contaminadas.

Sin embargo, los PL y TG específicos no se identificaron individualmente, se encontraron un grupo completo de lípidos sobreexpresados. Finalmente, se debe indicar, que algunos de estos biomarcadores eran específicos del tejido analizado, ya que los niveles alterados de éstos se encuentra sólo en uno de ellos, mientras que otros eran comunes a todas las muestras estudiadas en diferentes puntos de muestreo.

Metabolito	Metlin ID	Tejido biológico	Niveles
Fosfolípidos	-	Glándula digestiva, músculo, branquias y glándula antenal	↓
Colina	56	Branquias	↑
Fosfocolina	3,318	Glándula antenal	↑
Carnosina	38	Glándula digestiva	↓
Ascorbato (Vitamina C)	249	Glándula digestiva	↓
Niacinamida (Vitamina B3)	1,497	Glándula digestiva	↓
Ácidopantoténico (Vitamina B5)	241	Glándula digestiva	↓
Ácidopantoténico	276	Glándula digestiva	↓
Ácido úrico	956	Branquias	↑
Glucosa	88	Glándula antenal y músculo,	↓
Glucose-6-fosfato	133	Músculo	↓
Glucosa	145	Músculo y glándula antenal	↓
Alanina	11	Glándula digestiva, músculo	↓
Arginina	13	Músculo	↓
Triglicéridos	-	Glándula digestiva, branquias	↓

Tabla 2. Biomarcadores potenciales de contaminación medioambiental, aumento (↑) o disminución (↓) de la expresión en las grupo de control (LDP) vs demás muestras.

3.3. DISCUSIÓN

El análisis discriminante de huellas dactilares metabolómicas de tejidos de cangrejo del Parque Nacional de Doñana mostró claras diferencias entre los especímenes capturados en áreas contaminadas y no contaminadas. Por lo tanto, varios metabolitos se identificaron como posibles biomarcadores de contaminación que podrían ser utilizados como indicadores del estado del medio ambiente, pero además, esta información es de gran valor en el estudio del modo de acción (MOA) de sustancias tóxicas.

La disminución de la expresión de fosfolípidos, ascorbato, y carnosina y la sobreexpresión de fosfocolina, colina, y ácido úrico son indicativos del deterioro oxidativo debido a un desequilibrio entre la tasa fisiológica de producción de oxidantes y el tiempo de respuesta del sistema de defensa antioxidante. En toxicología acuática, el estrés oxidativo se ha convertido en un tema importante en la exposición ambiental a ambos factores estresantes antropogénicos (contaminación por sustancias tóxicas) y factores estresantes naturales

(relacionados con la salinidad, la temperatura y el oxígeno y las infecciones bacterianas y víricas). En particular, hay un gran interés en la producción especies reactivas de oxígeno (ROS) estimulada por contaminantes, y el daño oxidativo que resulta en proteínas, lípidos y ADN como un mecanismo de respuesta a las sustancias tóxicas en los organismos acuáticos [5].

Puede destacarse la acción de los radicales libres sobre los fosfolípidos, debido a la elevada presencia de ácidos grasos insaturados, lo que provoca la peroxidación de los lípidos con la consecuente pérdida de la integridad de la membrana y su función, y como resultado daño estructural y funcional de las células, tejidos y órganos [6]. Por tanto, la disminución de los niveles de fosfolípidos totales es consistente con esta lesión oxidativa, así como con el aumento de productos de degradación de fosfatidilcolinas: colina libre, y fosfocolina, que pertenecen a una de las más importantes familias de fosfolípidos (tabla 1).

Otros cambios metabólicos importantes relacionadas con el estrés oxidativo presentes en los perfiles metabolómicos de *P. clarkii* expuestos a contaminantes son las deficiencias de ascorbato y carnosina. Mientras que el ácido ascórbico es uno de los antioxidantes más estudiados que protege frente a la acción de los radicales libres, la carnosina es un dipéptido que también presenta efectos protectores; previniendo la peroxidación de los lípidos, proteínas y carbohidratos por ROS, y como protector de 4-hidroxi-2-nonenal y malonaldehído, y previniendo la glicación de proteínas [7]. También se ha demostrado que la carnosina actúa como agente neutralizador de los daños inducidos por sobrecarga de Cu en las células humanas cultivadas, y es un antioxidante eficaz que puede contribuir a la dismutación de radicales superóxido, elimina los radicales hidroxilo, y neutraliza la peroxidación lipídica [8]. En este sentido, el agotamiento de los sistemas de defensa antioxidantes celulares se ha relacionado con la exposición tóxica, causando disminuciones en la protección antioxidante primaria por las enzimas superóxidodismutasa (SOD) y catalasa (CAT), y los niveles de antioxidantes no enzimáticos [9].

Finalmente, también hay evidencia hiperuricemia en el desarrollo del estrés oxidativo, ya que el exceso de ácido úrico puede estar asociado con la sobreexpresión de la xantina oxidasa (XO), una enzima implicada en el catabolismo de las purinas que genera ROS endógenas. La inducción de la actividad de XO ha sido estudiada previamente respecto a la exposición de contaminantes, principalmente Cd, causando la conversión de la xantina deshidrogenasa, en xantina oxidasa y anomalías en los transportadores de urato [10]. Teniendo en cuenta que el cadmio es una sustancia tóxica importante, presente en las áreas contaminadas por metales considerados en este estudio, pero está prácticamente ausente en el sitio de referencia (Capítulo 2 tabla 3), se espera que una sobreactivación de XO, de lugar a la acumulación de ácido úrico en estas muestras (tabla 1).

CAPÍTULO 3

Los cambios en las vías de producción de energía, inducidos por contaminantes, representan también un importante efecto nocivo de la contaminación. Uno de los factores más importantes relacionados con el metabolismo energético, presente en los crustáceos, es la disminución de la absorción de oxígeno asociada a una reducción significativa en la oxigenación debido a los daños en branquias por los contaminantes, incluyendo metales. Esta hipoxia generada por la exposición a largo plazo produce una respuesta hipoglucémica y la perturbación del metabolismo anaeróbico [11] que conduce a la disminución de los niveles de carbohidratos y compuestos que participan en la glucólisis en los tejidos de los organismos expuestos, mientras que niveles de lactato elevados es normalmente observado como consecuencia de una mayor anaerobiosis [12]. En este sentido, la disminución de glucosa y glucosa-6-fosfato que se han observado en las muestras de *P. clarkii* de las zonas contaminadas, demuestra una disfunción de la glicolisis, pero además también se observa una reducción de la presencia de alanina en estas muestras. La alanina, así como el succinato, son productos finales de la rotura anaeróbica de la glucosa y su desregulación se ha asociado con alteraciones del metabolismo de la energía, comprobándose su reducción en numerosas experiencias de exposición a contaminantes metálicos en bivalvos [13-15].

Por otro lado, la hipoxia que se origina es responsable de la liberación de ROS, aumentando el daño oxidativo que puede interferir directamente en el metabolismo energético a través del fallo mitocondrial, y la fosforilación oxidativa (OP) alterada [16]. Esto ha sido previamente relacionado con la disminución del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en otras especies incluyendo la disminución de la actividad lactato deshidrogenasa y un aumento en el contenido de lactato, la movilización reducida de piruvato en el ciclo, y la disminución de la actividad de las enzimas relacionadas tales como la succinato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa [12]. En nuestro caso, las deficiencias de vitaminas B (niacinamida y ácido pantoténico), que es requerida como coenzima para el mantenimiento de la función mitocondrial, podría indicar un OP deteriorada. La niacinamida (B3) se precisa para suministrar protones en la fosforilación oxidativa, mientras que el ácido pantoténico (B5) está implicado en la formación de coenzima A y también es esencial para la α -cetoglutarato y complejos piruvato deshidrogenasa, así como la oxidación de ácidos grasos [17]. Por lo tanto, este estado anormal del contenido de vitaminas del grupo B podría emplearse potencialmente como un índice de la función adecuada mitocondrial. Los niveles de arginina también están estrechamente relacionados a este metabolismo energético ralentizándolo ya que el equilibrio arginina/phosphoarginine es responsable de la amortiguación de la energía en situaciones de demanda de alta energía en invertebrados, habiéndose demostrado que los niveles de ATP están protegidos por este ciclo en cangrejos sometidos a hipoxia por la exposición a Pb, causando disminución en la relación ATP/ADP debido al aumento de los niveles de ADP [18]. Además,

se ha propuesto este agotamiento de la arginina y la relación ATP/ADP como biomarcadores del trastorno del metabolismo energético en los bivalvos expuestos a Hg [14, 19]. De este modo, podría considerarse los niveles bajos de arginina en músculos de especímenes de *P. clarkii* expuestos a contaminantes como marcador fiable de la disfunción de la energía.

Finalmente, los niveles alterados de acetyl- carnitina y acetoacetato, que están implicados en el metabolismo de lípidos, también podría estar asociado con este estado de energía reducida. La acetyl-carnitina está en equilibrio con carnitina y acetyl-coenzima A, controlando el transporte de ácidos grasos en la mitocondria para su oxidación.

Por otro lado, el acetoacetato es un cuerpo cetónico derivado de la acetyl-coenzima A durante la oxidación de ácidos grasos libres, cuya inhibición se observa en bivalvos expuestos a metales [14, 20]. En este sentido, se observó un incremento de acetyl-carnitina y una disminución de acetoacetato que refleja los efectos de la contaminación en cangrejos, lo que sugiere un cambio en el metabolismo energético por la β -oxidación de ácidos grasos. Por lo tanto, se puede concluir a partir de todo lo comentado respecto a los perfiles metabólicos de *P. clarkii*, que existe un desequilibrio global en las vías de producción de energía (figura 4), en la que la mayoría de los cambios metabólicos importantes tuvieron un impacto sobre la glucólisis, la anaerobiosis, la β -oxidación y el ciclo de arginina; tal como se indica en los valores de los *VIP plots*. Por último, además de las alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo y los cambios en el metabolismo de energía, la reducción en los niveles de triglicéridos denotan una situación de dislipidemia, lo que podría estar relacionado con una nefrotoxicidad y una insuficiencia hepática. Por lo tanto, los cambios en el contenido de lípidos han demostrado que se está produciendo una respuesta inducida al estrés común en crustáceos como consecuencia de la exposición tanto a contaminantes inorgánicos [20-21] como orgánicos [22].

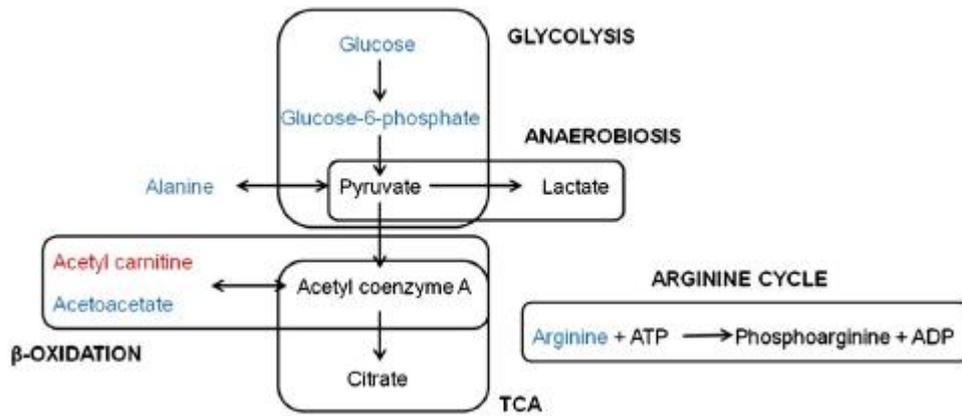


Figura 4. Representación esquemática de las rutas metabólicas en las que se ven implicados los metabolitos alterados en *P. clarkii*. Los metabolitos marcados en rojo aumentan o se sobreexpresan en zonas contaminadas y en azul disminuyen; en negro no experimentan cambios [1]

IV. CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos en este estudio metabolómico de la exposición del crustáceo *P. clarkii* a la contaminación metálica del Parque Nacional de Doñana, se puede concluir lo siguiente:

- ✓ Los resultados obtenidos con los extractos polares proporcionan más información que los extractos apolares, ya que en la primera extracción polar se aíslan un mayor número de metabolitos.
- ✓ Se obtienen resultados más concluyentes cuando se analiza la glándula digestiva por su mayor actividad metabólica, Las branquias proporcionan una información mucho más limitada.
- ✓ Se consigue una mayor discriminación entre las muestras cuando se llevan a cabo los análisis con el espectrómetro de masas en modo positivo, que permite generar un mayor número de metabolitos ionizables en estas condiciones experimentales.
- ✓ Si comparamos los perfiles obtenidos en el análisis discriminante:
 - ✓ Los perfiles metabolómicos mostraron ser claramente diferentes para los individuos de LDP frente a los restantes puntos de muestreo.
 - ✓ La integración del análisis metabolómico en los tejidos de cangrejo del PND y sus alrededores, y las concentraciones totales de metales ha permitido la evaluación de la contaminación ambiental en esta importante reserva ecológica.
- ✓ Este estudio ilustra que la metabolómica basada en la espectrometría de masas en tándem proporciona un método muy sensible para obtener la información de los perfiles metabólicos y de los metabolitos asociados a ellos. Que deriva en una información muy valiosa respecto al estrés inducido por los contaminantes, constituyendo una metodología eficiente para la caracterización de la respuesta biológica a metales pesados y posiblemente otro tipo de contaminación.
- ✓ La combinación de metabolómica y perfiles de metales permite una discriminación más eficaz del nivel de contaminación (asociada principalmente con los metales en este estudio, pero extensible a otros contaminantes) y su efecto sobre los organismos de vida libre en las cinco áreas en estudio, con contaminación diferencial, desde el Matochal, altamente contaminada al Lucio del Palacio, utilizado como control.
- ✓ Ha sido posible establecer alteraciones metabolómicas asociadas a la respuesta toxicológica, como el estrés oxidativo y la disfunción energética, asociadas a la alteración en los niveles de fosfolípidos y su degradación, así como cambios en los niveles de fosfolípidos, glucosa, alanina, arginina, o diferentes vitaminas, entre otros.

CAPÍTULO 3

- ✓ Como conclusión final puede decirse que se ha demostrado el impacto que los contaminantes metálicos tienen en el metabolismo de *P. clarkii* que constituye un buen bioindicador de contaminación, pero aún se precisan estudios complementarios para comprender las respuestas de estos organismos de vida libre a un solo metal, o a otros contaminantes, así como la cuantificación de metabolitos identificados como biomarcadores.

V. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Gago-Tinoco A, González-Domínguez R, Blasco-Moreno J, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. *Environ Sci Pollut Res*. 2013; 21:13315-13323.
- [2] González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Metabolomic approach to Alzheimer's disease diagnosis based on mass spectrometry. *Chem Pap*. 2012; 66(9):829–835.
- [3] Grimalt JO, Ferrer M, Macpherson E. The mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci Total Environ*. 1999;242(1–3):3–11.
- [4] García-Sevillano, M., González-Fernández, M., Jara-Biedma, R., García-Barrera, T., López-Barea, J., Pueyo, C., Gómez-Ariza, J.L. (2012) Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 404(6–7), 1967–1981.
- [5] Livingstone, D.R. (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull*. 42, 656–666.
- [6] Winston, G.W., Di Giulio, R.T. (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol*. 19, 137–161.
- [7] Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, Ames BN. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1988; 85:3175–3179.
- [8] Arnal N, de Alaniz MJT, Marra CA. Carnosine and neocuproine as neutralizing agents for copper overload-induced damages in cultured human cells. *Chem-Biol Interact*. 2011; 192(3):257–263.
- [9] Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Res*. 2009; 674:137–147.
- [10] Wang SY, Stickle WB. Biochemical composition of the blue crab *Callinectes sapidus* exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *Mar Biol*. 1988; 98:23–30.
- [11] Bonvillain CP, Rutherford CA, Kelso WE, Green CC. Physiological biomarkers of hypoxic stress in red swamp crayfish *Procambarus clarkii* from field and laboratory experiments. *Comp Biochem Physiol A- Mol Integr Physiol*. 2012; 163:15–21.
- [12] Reddy PS, Bhagyalakshmi A. Changes in oxidative metabolism in selected tissues of the crab (*Scylla serrata*) in response to cadmium toxicity. *Ecotox Environ Safe*. 1994; 29:255–264.

- [13] Zhang L, Liu X, You L, Zhou D, Yu J, Zhao J, et al. Toxicological effects induced by cadmium in gills of Manila clam *Ruditapes philippinarum* using NMR-based metabolomics. *Clean Soil Air Water*. 2011a; 39:989–995.
- [14] Liu X, Zhang L, You L., Cong M, Zhao, J., Wu, H., et al. Toxicological responses to acute mercury exposure for three species of Manila clam *Ruditapes philippinarum* by NMR-based metabolomics. *Environ Toxicol Phar*. 2011a; 31:323–332.
- [15] Blasco J, Puppo J. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol*. 1999; 122(2):253–263.
- [16] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press; 1999.
- [17] Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. *Chem-Biol Interact* 2006; 163:94–112.
- [18] Morris S, Van Aardt WJ, Ahern MD. The effect of lead on the metabolic and energetic status of the Yabby, *Cherax destructor*, during environmental hypoxia. *Aquat Toxicol*. 2005; 75:16–31.
- [19] Liu X, Zhang L, You L, Yu J, Cong M, Wang Q, et al. Assessment of clam *Ruditapes philippinarum* as heavy metal bioindicators using NMR-based metabolomics. *Clean Soil Air Water*. 2011b; 39:759–766.
- [20] Torreblanca A, Del Ramo J, Díaz-Mayans J. Effects of cadmium on the biochemical composition of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). *Bull Environ Cont Toxicol*. 1991; 47, 933–938.
- [21] Chinni S, Yallapragada PR. Energy levels of *Penaeus indicus* postlarvae on exposure to lead. *Ecotox Environ Safe* 2002; 52:173–179.
- [22] Wang J, Pan Y, Hong Y, Zhang QY, Wang XN, Kong LD. Quercetin protects against cadmium-induced renal uric acid transport system alteration and lipid metabolism disorder in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 2012:548430.

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Procedimiento experimental de muestras para análisis metabolómico

Figura 2. Scores plots de PLS -DA teniendo en cuenta extractos polares de glándulas digestivas de *P. Clarkii* en 5 puntos de muestreo.

Figura 3. Scores plots de PLS -DA teniendo en cuenta LDP frente al resto de puntos de muestreo en extractos de glándulas digestivas de *P. Clarkii*.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros estadísticos de los modelos PLS-DA.

Tabla 2. Biomarcadores potenciales de contaminación medioambiental, aumento (↑) o disminución (↓) de la expresión en las grupo de control (LDP) vs demás muestras.

**CAPÍTULO 4: Búsqueda de biomarcadores
metabolómicos en *Ruditapes philippinarum*
sometido a experiencias de exposición a fármacos**

I. ANTECEDENTES

1.1- ENSAYOS DE LABORATORIO Y DE CAMPO

Los ensayos de toxicidad son los bioensayos empleados para identificar y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. Su aplicación se centra en el ámbito regulador (registro de nuevas sustancias o productos), en la vigilancia y control ambiental (monitorización de efluentes, vertidos mineros o petrolíferos) y en la investigación (profundización de los mecanismos toxicológicos). En los bioensayos se usa tejido vivo, organismos, o grupo de organismos, para evaluar los efectos de cualquier sustancia fisiológicamente activa. Estos ensayos consisten en la exposición de grupos de organismos a determinadas concentraciones de tóxico por un tiempo determinado. Los organismos utilizados deben presentar una alta disponibilidad durante todo el año, fácil mantenimiento, alta sensibilidad e importancia económica / ecológica / biológica, además de existir información suficiente sobre su biología, genética, fisiología etc. El género molusco bivalvo *Ruditapes* es ampliamente usado por la comunidad científica en este tipo de experimentación por cumplir los requisitos anteriores [1-4].

Los organismos, asimismo, tienen que estar en buenas condiciones de salud, previamente aclimatados a las condiciones del ensayo, y mantenerse en condiciones ambientales constantes. Además se debe disponer de grupos de control (no expuestos al tóxico). Posteriormente se miden y registran los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y los expuestos y, posteriormente, se efectúa un análisis estadístico de los datos obtenidos.

Las medidas de biodisponibilidad y efecto a través de los biomarcadores, así como la bioacumulación de contaminantes, evaluados en *Ruditape sp* considerados con mayor amplitud en la bibliografía son: acumulación y daños en tejido biológico, alteraciones en la actividad de enzimas antioxidantes, daños en el ADN, cambios en el tamaño y forma celular, anomalías en el crecimiento somático y variaciones tanto en el desarrollo embrionario como en el sistema hormonal que pueden provocar cambio de sexo. También se determinan parámetros de mortalidad mediante la concentración letal 50 (CL50), que es la concentración letal para el 50 % de los individuos expuestos [5-9].

Los ensayos en los que se emplea el género molusco *Ruditapes* como organismo bioindicador pueden practicarse en condiciones de laboratorio (con un número reducido de especies, y en condiciones estandarizadas que reproducen solo en forma muy parcial las condiciones naturales en el ambiente) o in situ (con “jaulas” sometidas a las condiciones del medio natural).

CAPÍTULO 4

En los ensayos de laboratorio los organismos se exponen a diferentes fuentes de estrés ambiental en acuarios con sistemas de aireación de flujo continuo. Los sistemas de bombeo de agua son controlados mediante bombas peristálticas [10]. En esta clase de experimentos los bivalvos son suspendidas en el medio del acuario dentro de un vaso “caja”, con la base cubierta por una red, diseñada para reducir al mínimo la manipulación de los individuos, de esta forma la renovación del agua y la limpieza podrán llevarse a cabo sin la manipulación de los organismos [11]. Los replicados son usados [10,12-13]. Los grupos son introducidos en tanques diferentes e independientes entre sí [14-15]. Se suelen dividir a los organismos por grupos en función de su sexo, fase del ciclo vital y tamaño [16] cuando se estudian los efectos de la toxicidad en determinados periodos de la fase vital. Durante la experimentación el agua es renovada y las concentraciones de los tóxicos se re-estabilizan [12, 13, 17]. Los organismos se alimentan con mezclas de fitoplancton [11-12, 19-21] excepto en aquellos experimentos cuyo objetivo es evaluar la variación morfológica y de crecimiento de los individuos cuando se exponen al contaminante [22-23]. Este tipo de experimentación permite la comparación de especies de diferentes niveles tróficos y la posibilidad de utilizar especies más sensibles, sin embargo, esto origina incapacidad para predecir efectos bajo condiciones de campo y solo pueden ser aplicables a especies probadas [23].

Para los ensayos de laboratorio existen protocolos estandarizados desarrollados por distintos organismos, cuyas ventajas son útiles para la monitorización de rutina, facilitan la comparación de resultados entre distintos laboratorios, etc. Estos protocolos son: APHA (American Public Health Association), EPA (Environmental Protection Agency), ASTM (American Society for Testing and Materials), ISO (International Standardization Organization) y OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Los protocolos de los métodos de ensayo de toxicidad legales en la UE se basan en las Directrices de la OECD. Esta disponibilidad de metodologías estandarizadas va a ocasiona desviaciones de las condiciones reales en el campo [23]. En los ensayos de campo los organismos son expuestos a los sedimentos y a la columna de agua de forma natural o artificial. Si el ensayo se realiza de forma natural los organismos nativos son recolectados de la zona intermareal o submareal a mano [24-25], por el contrario si se lleva a cabo de forma artificial se emplean jaulas bentónicas [26] o pelágicas sostenidas con un sistema de flotación (figura 1). Estos tipos de ensayos son utilizados para estudios de seguimiento de vertidos antropogénicos (industriales, mineros, afluentes etc.) [27-28]. Los duplicados son usados al igual que los ensayos en laboratorio [26].



Figura 1. Jaula para estabulación de organismos (fotografía izquierda) y ensayos de toxicidad en laboratorio (fotografía centro y derecha). Especie: *Ruditapes philippinarum*.

Los bioensayos in situ presentan una serie de ventajas respecto a los ensayos de toxicidad realizados en laboratorio. Frente a los ensayos de laboratorio, la utilización de animales en jaulas bentónicas muestra información sobre la toxicidad bajo condiciones naturales, no controladas, integrando el papel que desempeñan tanto los contaminantes presente en el medio natural como las variaciones físico-químicas del mismo, las cuales afectan a la biodisponibilidad de los contaminantes [29], sin embargo, esto hace que los ensayos de campo no permitan aislar los factores causantes de estrés [23]. También, estos bioensayos posibilitan la identificación de fuentes de contaminación que quedan excluidas en los ensayos de laboratorio y que pueden dar lugar a alteraciones biológicas [29] y por último, proporcionan evidencias del deterioro e indican los contaminantes responsables de la afectación [23].

El género molusco bivalvo *Ruditapes* se usa con más frecuencia en los ensayos de laboratorio que los realizados en campo, ya que en el 63 % de los artículos revisados este organismo es empleado en experimentos de laboratorio frente al 37 % realizado en el campo. Estos datos muestran que el *Ruditapes sp* es más idóneo para bioensayos de laboratorio que de campo, obteniéndose en este tipo de experimentos resultados más óptimos y fiables. Entre las sustancias usadas en los ensayos, las más utilizadas son los metales (44 %) seguido de los TBTs (14 %), mientras que en campo siguen dominando los estudios de metales (34 %) seguidos de los PAHs (22%). Estos bivalvos, como indican los resultados, presentan la ventaja de ser organismos bioindicadores para una amplia gama de sustancias lo que aumenta la posibilidad de realización de estudios en los que se pretende conseguir la integración del efecto de varios contaminantes, permitiendo adaptar el experimento de una forma más precisa y real a las condiciones del campo, ya que se está analizando al mismo tiempo las interacciones de varios contaminantes con el entorno natural, situación muy similar a lo que ocurre realmente en el medio natural. De esta forma se recomienda la utilización de *Ruditapes sp* en aquellos trabajos de investigación que tengan como fin la evaluación riesgo ecológico mediante ensayos de toxicidad en laboratorio. Para finalizar, el hecho de que *Ruditapes sp* sea una especie epibentónica va permitir evaluar tanto la calidad del agua como la del sedimento, ya que al

CAPÍTULO 4

situarse en la interfase agua-sedimento van a filtrar los contaminantes que están biodisponibles tanto en el agua como en el sustrato. El hecho de que los organismos habiten en la interfase va a facilitar a los investigadores la posibilidad de estudiar y analizar el comportamiento y las respuestas de los contaminantes biodisponibles en dos compartimentos ambientales diferentes, realizando un estudio integrado de ambos.

1.1.1- Ensayos de toxicidad agudos y crónicos. Bioacumulación

Los ensayos de ecotoxicidad aguda se usan para establecer una primera estimación de la toxicidad y estimar si se necesitan estudios posteriores. También se usan para monitorizar la toxicidad de los efluentes [30]. Se diseñan para medir los efectos de los agentes tóxicos durante un período corto de la vida de los organismos expuestos (≤ 96 h). La respuesta observada es la muerte para el caso de peces, moluscos, entre otras. Y los parámetros estimados son: CL50 (muerte), o CE50 (concentración de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos).

El objetivo de los ensayos de ecotoxicidad crónica es establecer las concentraciones ambientalmente seguras. Se diseñan para evaluar los posibles efectos adversos de las sustancias químicas bajo condiciones de exposición a largo plazo (> 10 % ciclo vital) utilizando concentraciones subletales. Las respuestas observadas en los ensayos de ecotoxicidad crónica (principalmente subletales, biomarcadores) son: alteraciones en el crecimiento [3], reproducción [15] comportamiento [31], parámetros fisiológicos y bioquímicos [32-33]. Los parámetros estimados son: NOEC (concentración sin efecto observable), LOEC (concentración mínima de efecto observable) y MATC (concentración tóxica máxima aceptable).

La medida de las respuestas de los individuos (biomarcadores) a los contaminantes permite el establecimiento de las relaciones dosis-respuesta, que forman la base de las pruebas de toxicidad. Sin embargo, en ecotoxicología acuática, la dosis a menudo se sustituye por la concentración debido a la dificultad de administrar dosis orales o inyectables. La dosis o las relaciones de concentración-respuesta se pueden obtener a partir de estudios de laboratorio y / o en el campo [34].

Cuando hablamos de contaminantes como fuentes de estrés ambiental, éstos si están biodisponibles, penetran en las almejas desde el agua, el sedimento o el alimento por medio de las branquias y se acumulan principalmente en la glándula digestiva vía hemolinfa [19-20]. El sistema digestivo de los moluscos bivalvos desempeña muchas funciones asociadas con los vertebrados, tales como la absorción y el transporte de partículas alimentarias, la secreción de enzimas hidrolíticas o digestivas que catalizan la degradación de moléculas de gran tamaño para formar fragmentos más pequeños mediante unas reacciones que se conocen con el nombre de

reacciones hidrolíticas y el almacenamiento de lípidos, glucógeno y minerales [35]. Una vez que el contaminante se encuentra en el interior del organismo se produce su biotransformación.

A. TOXICIDAD AGUDA: CE50 O CL50

La toxicidad aguda es aquella en la que los efectos adversos aparecen rápidamente tras una exposición o una dosis única suficientemente alta. En el laboratorio, la toxicidad se mide generalmente mediante pruebas estandarizadas de corto plazo (e.j., OECD 2003) con la mortalidad, la inmovilidad o inhibición del crecimiento como puntos finales. Estos estudios permiten obtener información cuantitativa para el establecimiento de datos ecotoxicológicos expresados como concentración efectiva media o letal (CE50 o CL50).

B. TOXICIDAD CRÓNICA

La toxicidad crónica es aquella en la que los efectos adversos aparecen tras una exposición prolongada. Entre los efectos subletales que se miden en los ensayos de toxicidad crónica, se encuentran los biomarcadores. Su análisis facilita el establecimiento de mecanismos de toxicidad [26]. Es posible analizar el impacto de los agentes estresantes en las almejas con varios tipos de biomarcadores. En general, los biomarcadores de efecto más sensibles son las alteraciones en los niveles y actividades de las enzimas de biotransformación. En almejas, la actividad de estas enzimas puede ser inducida o inhibida tras la exposición a contaminantes [26], como metales, fármacos y PAHs. La inducción de la actividad del citocromo P450 fue observada como consecuencia de la exposición a carbamazepina (fármaco anti compulsivo y estabilizador del estado de ánimo) [36] y a metales [21].

En la mayoría de los ensayos desarrollados con diferentes contaminantes es necesario conocer la biodisponibilidad de éstos para la especie bioindicadora así como una acumulación en sus tejidos biológicos, principalmente en glándula digestiva y branquias.

OBJETIVO

El objetivo principal de este capítulo es el estudio de la respuesta biológica del bioindicador bivalvo *Ruditapes philippinarum* sometido a experiencias de exposición a diferentes fármacos (ibuprofeno, carbamazepina y diclofenaco) en condiciones de laboratorio controladas, que servirán específicamente para imitar los escenarios donde se encuentran los organismos en el medio ambiente natural. Los ensayos que se usan son diferentes de los utilizados en los capítulos anteriores, en los que los organismos usados como bioindicadores eran de vida libre y se estudiaban en el medio natural.

El estudio se ha desarrollado para evaluar la respuesta biológica a fármacos, expuestos a concentraciones subletales, con el objetivo de imitar las condiciones naturales y poder predecir cambios en biomarcadores metabolómicos. Una vez que se identifican los metabolitos que se alteraran, las rutas bioquímicas celulares alteradas permitirán la comprensión de los procesos bioquímicos asociados a la toxicidad de los fármacos.

II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

2.1.1. Espectrómetro de masas molecular

La caracterización de la composición de metabolitos en extractos se llevó a cabo en un espectrómetro de masas con analizador decuadrupolo - tiempo de vuelo modelo QSTAR XL Hybridsystem (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), equipado con fuente de ionización electrospray (ESI).

2.2. REACTIVOS

Metanol y cloroformo (HPLC-grade) fueron adquiridos de Fisher Scientific (Leicestershire, UK), mientras que el acetato de amonio y ácido fórmico fueron suministrados por Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). El agua se purificó con un sistema de gradiente Milli-Q (Millipore, Watford, UK).

Materiales estandarizados de carbamazepina (CBZ; CAS number 298-46-4), ibuprofeno (IBU; CAS number 15687-27-1) y diclofenaco (DCF; CAS number 15307-79-6) con una pureza mayor al 98% así como dimetilsulfoxido (DMSO; CAS number 67-68-5; pureza 99.9%) fueron obtenidos de Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany).

2.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

2.3.1. Diseño de la experiencia de exposición

Los especímenes de *R. philippinarum* se expusieron a los tres productos farmacéuticos (carbamazepina, ibuprofeno y diclofenaco) utilizando una dosis subletal o una concentración relevante para el medio ambiente de 15 g/L, cada uno de los fármacos se disolvió individualmente en sulfóxido de dimetilo, DMSO.

Con este fin, se utilizaron quince acuarios de la manera que sigue, empleando tres replicados de cada experimento: (i) control de agua de mar, (ii) el control de DMSO, (iii) almejas expuestas a la carbamazepina, diclofenaco e ibuprofeno. Antes de comenzar, los organismos se pre-aclimataron durante 7 días y más tarde se mantuvieron en condiciones semi-estáticas en acuarios (30 L) con aireación y agua de mar filtrada (0,45 μm). Para la alimentación se usó una mezcla de microalgas *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis galbana*, que se suministró cada día durante dos horas antes de la renovación medio. Se llevó a cabo un control diario de variables físicas y químicas para mantener las condiciones de oxígeno disuelto ($9,2 \pm 1,1$ mg/L), pH ($8,3 \pm 0,9$), salinidad ($35,1 \pm 4,4$ PSU), y la temperatura ($21,1 \pm 0,4$ °C).

CAPÍTULO 4

El tiempo total de la experiencia fue de 22 días, con 14 días de exposición a los fármacos y 8 días para la depuración (sin exposición a fármacos). De esta forma, tres muestras se tomaron a lo largo del período de exposición en diferentes momentos, al inicio (control, C), después de 3 y 24 horas (exposición a corto plazo), después de 7 y 14 días (exposición a largo plazo), y después de 22 días (tras la depuración). Además, se llevaron a cabo dos experiencias de control adicionales que se mantuvieron en paralelo sobre la experiencia de exposición; en agua de mar limpia (control de agua de mar, SW-C) y agua de mar conteniendo DMSO (control de disolvente, S-C) y se recogen al final de estos 22 días, a fin de vigilar el posible efecto del tiempo de exposición y el disolvente en los organismos. Un esquema del diseño de exposición se muestra en la figura 2.

Finalizado el tiempo de exposición, las almejas se muestrearon y la glándula digestiva y las branquias se diseccionaron, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Todos los especímenes que habían sido muestreados o habían muerto, se repusieron en cada acuario con almejas marcadas con el fin de mantener constante el número de especímenes (30) a lo largo de la prueba.

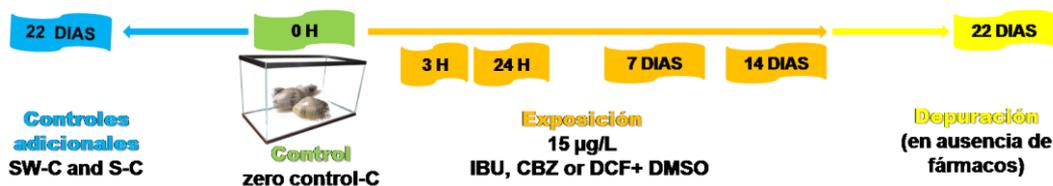


Figura 2. Diseño de exposición: representación cronológica de los puntos de muestreo. El zero control-C (verde) al inicio del experimento, hacia la izquierda se representan los controles adicionales (azul), y hacia la derecha el orden de muestreo para organismos expuestos (naranja) y depurados (amarillo).

2.3.2- Análisis metabolómico y quimiométrico

El análisis metabolómico y quimiométrico se llevó a cabo de forma análoga a la descrita en el Capítulo 3, utilizando un procedimiento de extracción de las muestras en dos etapas de las branquias y glándulas digestivas de especímenes sometidos a experiencias de exposición a carbamazepina, ibuprofeno y diclofenaco. En los extractos se analizaron los metabolitos mediante espectrometría de masas QqQ-TOF-MS y tratamiento estadístico mediante análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) [37]

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y METABOLITOS ALTERADOS

Se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA, *partial least squares discriminant analysis*) en el que se tuvo en cuenta inicialmente los diferentes grupos de control (control zero C, control de agua de mar SW -C y control de disolvente SC) con el fin de comprobar que las alteraciones metabólicas se deben a la exposición al fármaco, independientemente del tiempo o la presencia de sulfóxido de dimetilo (DMSO) en el medio.

La figura 3 muestra un la gráfica de “scores” resultante del tratamiento estadístico PLS-DA, en el que todos los grupos de control procedentes de glándulas digestivas están estrechamente agrupados, y claramente separados de los grupos correspondientes a glándulas digestivas de organismos expuestos a carbamazepina, lo que demuestra el gran impacto de la toxicidad de los fármacos sobre el metabolismo sin tener en cuenta el efecto del disolvente o el tiempo de exposición, lo que concuerda con los hallazgos previos reportados por Rubín acerca de la poca actividad de DMSO en el sistema de células animales a bajo dosis [38].

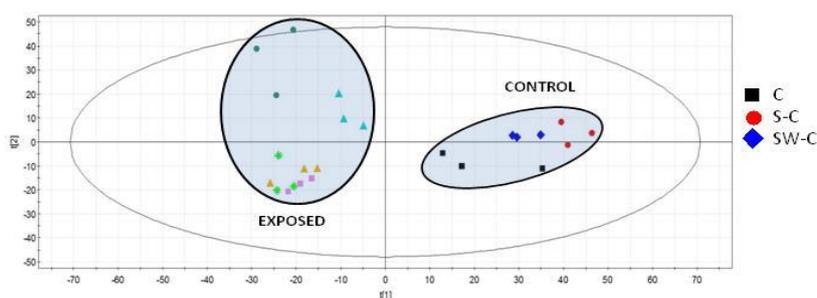


Figura 3. Gráficos de “scores” de PLS-DA teniendo en cuenta los diferentes subgrupos del estudio, el análisis en modo positivo de extractos polares en glándulas digestivas: CONTROL (C, SC y SW- C) y expuestos a carbamazepina (después de 3 horas, 24 horas, 7 días y 14 días de exposición y a los 22 días tras ser depurado).

Por lo tanto las muestras de los tres grupos de control se agruparon en una sola clase y se utilizaron como control para su posterior análisis. Los datos se procesaron de nuevo de acuerdo con el tiempo de exposición (figura 4). Como puede observarse, la separación se produce a lo largo del primer componente estadístico, que manifiesta un cambio de valores positivo a negativos cuando el tiempo de exposición se incrementa de muestras de control a los de exposición a largo plazo. Además, las muestras correspondientes al período de depuración se agruparon entre los de exposición a corto y largo plazo, lo que indica la restauración parcial del estado metabólico durante este tiempo.

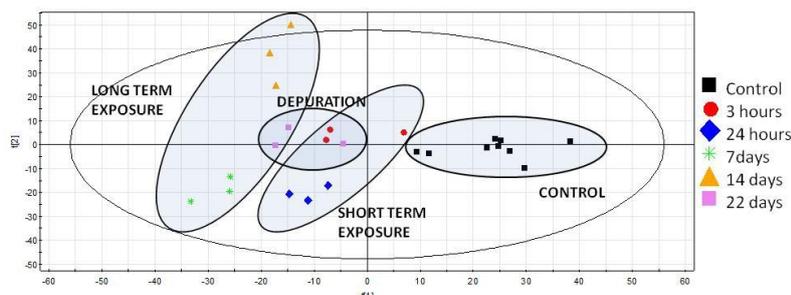


Figura 4. Gráficos de “scores” de PLS -DA teniendo en cuenta el tiempo de exposición en modo positivo de extractos polares de las glándulas digestivas de especímenes expuestos a la carbamazepina y grupo de control.

Debe tenerse en cuenta que los cambios metabólicos inducidos por fármacos eran comunes para los tres fármacos probados, que pueden estar relacionados con su modo no específico de acción tóxica (MoA) sobre los organismos. El más importante MoA no-específico de fármacos en estudios ecotoxicológicos es la narcosis [39-40], que constituye un estado reversible de la actividad vital que actúa secuestrando estructuras protoplasmáticas. Este efecto, también conocido como línea de base a la toxicidad, constituye la mínima toxicidad que un compuesto puede provocar [41]. En relación a lo anterior, la perturbación de la estructura de la membrana y su funcionamiento mediante medida de la disminución del potencial de membrana en vesículas fotosintéticas de membrana aisladas también se puede utilizar para evaluar los diferentes mecanismos tóxicos sobre la energía de la transducción, incluyendo la inhibición de la cadena de transferencia de electrones, el desacoplamiento y la inhibición la síntesis de adenosina trifosfato (ATP) [41]. Particularmente, Escher y col. demostraron que la carbamazepina, el ibuprofeno y diclofenaco, entre otros productos farmacéuticos comunes, que se encuentran en el medio ambiente, presentan toxicidad no específica en la vida acuática [42]. Por lo tanto, se puede concluir que las alteraciones metabólicas que se encuentran en *Ruditapes philippinarum* expuesta no se deben a la bioactividad de los productos farmacéuticos, sino que actúan principalmente a través de narcosis, por lo que la interpretación bioquímica de los resultados se puede generalizar a las tres experiencias de exposición.

De esta manera, se ha investigado recientemente que la carbamazepina y el ibuprofeno provocan daños moleculares similares en el mejillón *Dreissena polymorpha*, provocando cambios de ARNm de las enzimas y otras proteínas implicadas en la prevención del daños a proteínas y al estrés oxidativo, así como otras proteínas relacionadas con la desintoxicación de fármacos [43]. Además, Gravel y col. (2009) [44] demostraron previamente un mecanismo común para los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), respecto a la toxicidad en la trucha arco iris, por la ruptura de corticosteroidogénesis y la capacidad osmoregulatoria deteriorada, que fue acompañada por una mayor capacidad glicolítica en branquias.

Por último, se realizaron comparaciones de dos clases para simplificar la búsqueda de posibles marcadores de toxicidad inducida por fármacos. Teniendo en cuenta los grupos mostrados en la figura 4, se aplicó un análisis discriminante para comparar especímenes expuestos según la duración de la exposición (a corto y largo plazo) con muestras de control. Lográndose una separación clara entre el control y los grupos expuestos (figura 5), que muestra el fuerte impacto de los fármacos en el metabolismo tanto en la exposición temprana como en la prolongada.

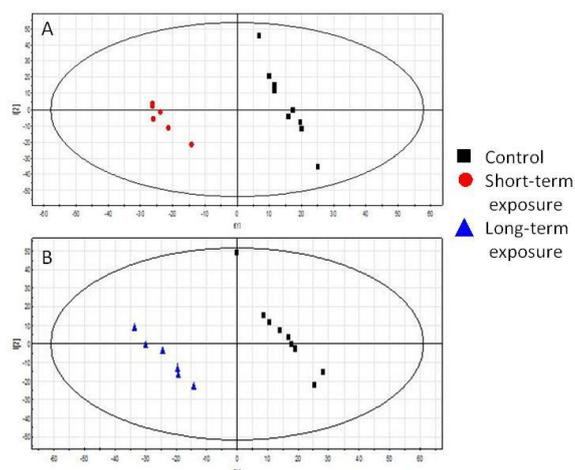


Figura 5. Gráficas de “scores” considerando los análisis de PLS -DA en el modo positivo de extractos polares en glándulas digestivas expuestas a corto plazo a carbamazepina vs grupo de control (A) y glándulas digestivas expuestas a largo plazo a carbamazepina vs grupo de control (B)

La separación por clases y el poder de predicción se utilizaron para evaluar la calidad de estos modelos estadísticos. En los tres modelos de componentes (figuras 3-5), se obtuvo una buena clasificación de las muestras, como se deduce de la representación de la gráfica de “scores” (figura 5) y los valores de R^2 , siempre por encima de 0,995 en todas las estadísticas realizadas con datos. Por otro lado, la validación del modelo usando una estrategia con n iteraciones produjo medidas Q^2 que oscilaban entre 0,6-0,8 para las muestras de branquias, y superior a 0,85 para las glándulas digestivas, lo que representa una información metabólica valiosa proporcionada por las glándulas digestivas.

Las representaciones de “loading” (no mostradas) permitieron identificar las señales MS de metabolitos que pueden ser importantes para la separación entre los grupos de control y los grupos expuestos. Sólo las señales estadísticamente significativas, de acuerdo con su importancia variable en la proyección (*Variable Importance in the Projection, VIP*, un parámetro predictivo indicativo de la importancia de la variable en el modelo), se seleccionaron como posibles marcadores, que se enumeran en la tabla 1. El hallazgo más notable fue que los

CAPÍTULO 4

metabolitos alterados fueron los mismos para las tres exposiciones de fármacos. Los cambios metabólicos importantes se observaron en glándula digestiva, sobre todo en relación con un aumento de los niveles de varios lípidos (fosfolípidos y ácidos grasos) y la alteración de la homeostasis de aminoácidos y ácidos orgánicos. En el caso de las branquias, se obtuvieron resultados complementarios, mostrando la posible especificidad tisular de algunos de estos marcadores. Cabe señalar que la identificación molecular de los lípidos individuales no se llevó a cabo, ya que la desregulación se encontró en toda la familia, en el intervalo de m/z de 650-850 para fosfolípidos y de 250-300 para los ácidos grasos libres.

Glándula digestiva			Branquias		
	Exposición a cortoplazo	Exposición a largo plazo		Exposición a cortoplazo	Exposición a largo plazo
Fosfolípidos	↑	↑	Fosfolípidos	↑	↑
Ácidos grasos poliinsaturados(PUFAs)	↓	↓	Ácidos grasos libres	↑	↑
Ácidos grasos libres	↑	↑	Urea	↑	↑
Glutamina	↓	↓	Guanidina	↑	↑
Glutamato	↑	↑	Betaina	↓	↓
Arginina	↑	↑			
Alanina	↑	↑			
Aspartato	↑	↑			
Succinato	↑	↑			
Lactato	↑	↑			
Taurina	↓	↓			

Tabla 1. Biomarcadores de toxicidad inducida por fármacos, aumento (↑) o disminución (↓) de la expresión en las muestras expuestas vs grupo de control.

Otro hallazgo importante es la evolución temporal de los perfiles metabólicos a lo largo de la experiencia de exposición. Por tanto, aunque se observan cambios metabólicos en tanto la exposición a corto y largo plazo para la mayoría de los biomarcadores potenciales descubiertos (tabla 1), hay una inducción dependiente del tiempo de exposición con respecto a los efectos adversos, como se muestra en la figura 5. Por otro lado, la mejora parcial del estado metabólico durante el período de depuración parece clara, lo que indica la posible reversibilidad de los mecanismos tóxicos de los productos farmacéuticos. Una vez que se lleva a cabo la identificación de los metabolitos que se alteraron, debe buscarse su imbricación con las rutas metabólicas fundamentales, con objeto de establecer los procesos bioquímicos alterados asociados a la toxicidad de los fármacos. De esta manera se pueden interpretar los resultados bajo un enfoque bioquímico-toxicológico como se ilustra en la figura 6 para las glándulas digestivas y las branquias.

3.2. METABOLÓMICA DE ENSAYOS DE EXPOSICIÓN A FÁRMACOS UTILIZANDO LA GLÁNDULA DIGESTIVA DE *R. PHILIPPINARUM*

Los cambios metabólicos más importantes que se producen en las glándulas digestivas traducen en el aumento de los niveles de fosfolípidos, ácidos grasos libres, arginina, glutamato, aspartato, succinato, lactato y alanina, y la disminución de la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, taurina y glutamina que permiten discriminar entre el control y las muestras expuestas (figura 6).

La acumulación de fosfolípidos y ácidos grasos libres podría estar relacionada con una alteración en el metabolismo hepático de las grasas, que se manifiesta en disfunciones como la esteatosis y la fosfolipidosis [45]. La esteatosis es un incremento en la acumulación de lípidos hepáticos, mientras que la fosfolipidosis es un desorden en el almacenaje en lisosomas que se caracteriza por la acumulación intracelular de fosfolípidos. Se ha comprobado que se producen cambios en el contenido de lípidos que son comunes a una respuesta inducida por el estrés por contaminantes y, de esta manera, la hiperlipidemia ha sido previamente relacionada con la exposición al fármaco en bivalvos [46].

La capacidad de los fármacos para perturbar el metabolismo energético y causar estrés metabólico en organismos acuáticos ha sido citada en numerosos artículos [44, 46-47]. En este sentido, la hipoxia inducida por el estrés ambiental, que conduce a anaerobiosis, es un sello distintivo común en la respuesta metabólica en la toxicología de los contaminantes en bivalvos y, en particular, se ha asociado previamente a la exposición de *R. philippinarum* a metales [32, 48] o contaminantes orgánicos como benzo (a) pireno [49].

Por lo tanto, el aumento de la alanina y el succinato, que constituyen los principales productos finales de la descomposición anaerobia de la glucosa en los bivalvos, así como la presencia de niveles de lactato elevados, podrían asociarse a trastornos del ciclo de la energía [50]. Lo más representativo del metabolismo anaeróbico en la célula, inducido por una mayor demanda de energía, es el aumento de la producción de amoníaco, debido a la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa, y la sobreexpresión de alanina y de aspartatoaminotransferasas [51]. Esta situación de hiperamonemia ha sido previamente relacionada con la exposición carbamazepina en la trucha arco iris [47, 52] y podría estar detrás del aumento en los niveles de aspartato y glutamato, junto con una disminución de glutamina, debido al proceso activado de desaminación de aminoácidos [53].

Por último, los niveles de arginina también se relacionan con el metabolismo energético, ya que el equilibrio arginina / fosfoarginina es responsable de la amortiguación de la energía en situaciones de demanda energética en invertebrados. El aumento de arginina y ATP se encuentra

en *R. philippinarum* expuesto a mercurio [54] y cadmio [55], y en el abalón, un molusco muy apreciado para el consumo, en estudios de exposición a cobre [56]; lo que sugiere una disfunción energética. De esta manera, los niveles elevados de arginina en glándula digestiva de *R. philippinarum* expuesta a fármacos pueden ser considerados como un marcador complementario de trastornos energéticos.

3.3. METABOLÓMICA EN BRANQUIAS DE *R. PHILIPPINARUM*

El sistema respiratorio es la interfaz más extensa entre un organismo acuático con el medio ambiente, y es con frecuencia el primer sistema afectado por contaminantes. En este sentido, las branquias pueden considerarse el principal órgano diana para la acumulación de contaminantes en bivalvos, y por tanto es potencialmente sensible y adecuado para la detección de biomarcadores metabólicos inducidos por contaminantes.

Sin embargo, el número de biomarcadores potenciales que se han encontrado en este tejido es considerablemente menor que en glándulas digestivas, probablemente debido a su actividad metabólica más reducida. Como resultados más destacados pueden mencionarse la presencia de niveles más elevados de lípidos (fosfolípidos y ácidos grasos), urea y guanidina, y reducción de betaína en muestras de branquias. Estos marcadores se pueden vincular a las diferentes patologías anteriormente mencionadas para las alteraciones metabólicas en glándulas digestivas (figura 6). Por tanto, la acumulación de lípidos y la disminución de la betaína están asociadas a respuestas como la dislipidemia y perturbaciones de la regulación osmótica, respectivamente. Por otro lado, la urea y la guanidina son los principales metabolitos implicados en la homeostasis del amoníaco, por lo que su incremento en las branquias refleja el proceso de hiperamonemia debido a la desaminación de aminoácidos y el exceso de activación de las transaminasas.

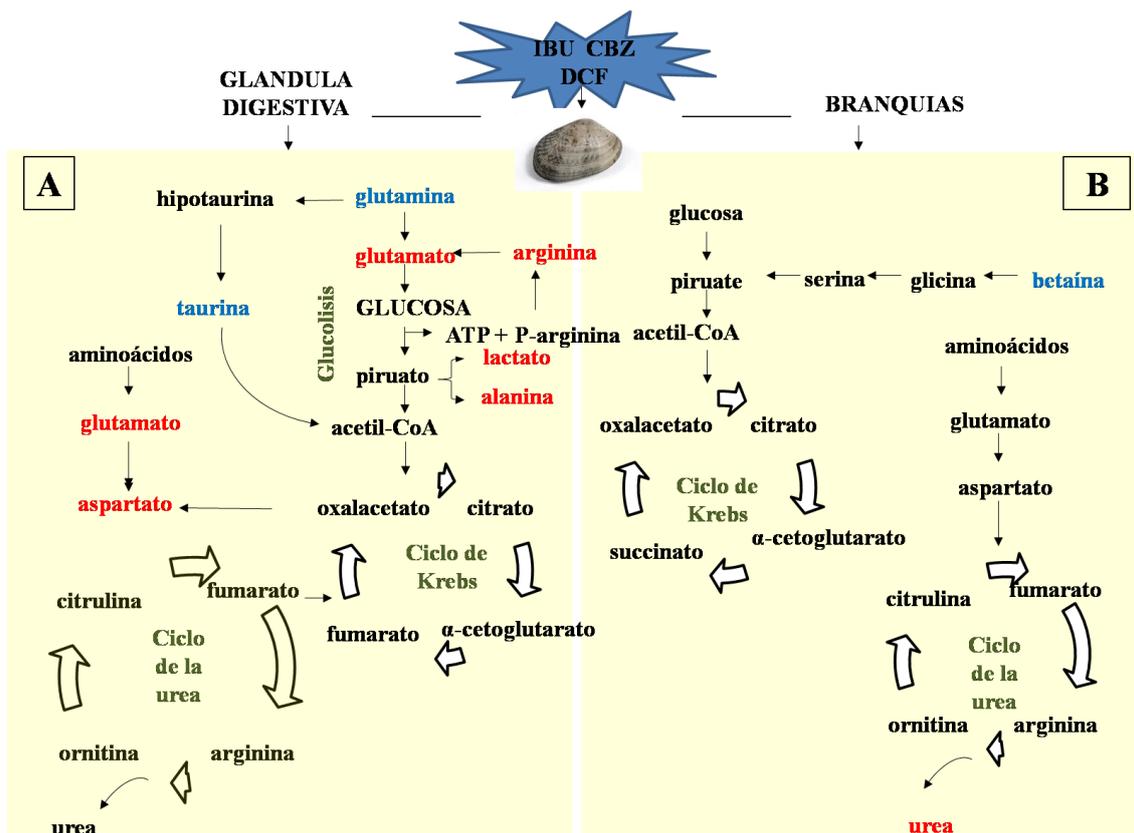


Figura 6. Representación esquemática de las rutas metabólicas en las que se ven implicados los metabolitos alterados por inducción de fármacos (ibuprofeno, carbamazepina y diclofenaco) en las glándulas digestivas (A) y branquias (B) de *R. philippinarum*. Los metabolitos marcados en rojo aumentan y en azul disminuyen.

IV. CONCLUSIONES

Este estudio considera las diferencias en los patrones de expresión metabólica del *R. philippinarum* que caracterizan la respuesta a la exposición a ibuprofeno (IBU), carbamazepina (CBZ) y diclofenaco (DCF) utilizando la glándula digestiva y las branquias como órganos diana.

Se comprueba que:

- ✓ El número de biomarcadores potenciales que se encuentran en branquias es considerablemente menor que en glándulas digestivas, probablemente debido a su actividad metabólica más reducida.
- ✓ Hay una inducción de metabolitos relacionados con efectos adversos dependiente del tiempo de exposición.
- ✓ Los cambios metabólicos inducidos por fármacos son comunes para los tres compuestos probados, lo que puede estar relacionados con su modo no específico de acción tóxica (MoA) sobre los organismos. Las alteraciones metabólicas no se deben a la bioactividad de los compuestos farmacéuticos, sino a su acción mediante procesos de narcosis, por lo que la interpretación bioquímica de los resultados se puede generalizar a las tres experiencias de exposición.
- ✓ Los cambios metabólicos en glándula digestiva, están relacionados con hiperlipidemia o alteración en el metabolismo hepático de las grasas, así como la alteración de la homeostasis de aminoácidos y ácidos orgánicos.
- ✓ Se ha encontrado desregulación en los niveles de lípidos, en el intervalo de m/z de 650-850 para fosfolípidos y de 250-300 para los ácidos grasos libres.
- ✓ Los fármacos perturban el metabolismo energético y causan estrés metabólico, en este sentido, la hipoxia inducida por el estrés ambiental originado conduce a anaerobiosis.
- ✓ La alanina y el succinato, que constituyen los principales productos finales de la descomposición anaerobia de la glucosa en los bivalvos, así como la presencia de niveles elevados de lactato, puede asociarse a trastornos del ciclo de la energía.
- ✓ Hay una situación de hiperamonemia, como consecuencia del metabolismo anaeróbico en la célula, inducido por una mayor demanda de energía, que es debido a la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa, y la sobreexpresión de alanina y de aspartatoaminotransferasas, que puede estar asociado al aumento en los niveles de aspartato y glutamato en glándula digestiva, junto con una disminución de glutamina, debido al proceso activado de desaminación de aminoácidos

CAPÍTULO 4

- ✓ El aumento observado de arginina y ATP sugiere una disfunción energética. De esta manera, los niveles elevados de arginina en glándula digestiva pueden ser considerados como un marcador complementario de trastornos energéticos.
- ✓ En branquias, la acumulación de lípidos y la disminución de la betaína están asociadas a respuestas como la dislipidemia y perturbaciones de la regulación osmótica, respectivamente. Por otro lado, la urea y la guanidina son los principales metabolitos implicados en la homeostasis del amoníaco, por lo que su incremento refleja el proceso de hiperamonemia debido a la desaminación de aminoácidos y el exceso de activación de las transaminasas.

V. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bebianno MJ, Nott JA, Langston WJ. Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussata*: the role of metallothioneins. *Aquat Toxicol.* 1993; 27:315-334.
- [2] Hamza-Chaffai A, Amiard JC, Pellerin J, Joux L, Berthet B. The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comp Biochem Physiol C.* 2000; 127:185-197.
- [3] Ji J, Choi HJ, Ahn IY. Evaluation of Manila clam *Ruditapes philippinarum* as a sentinel species for metal pollution monitoring in estuarine tidal flats of Korea: Effects of size, sex, and spawning on baseline accumulation. *Mar Pollut Bull.* 2006; 52:447-468.
- [4] Paul-Pont I, Montaudouin X, Gonzalez P, Jude F, Raymond N, Paillard C, et al. Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve *Ruditapes philippinarum* in European populations. *Environ. Pollut.* 2010; 158:3401-3410.
- [5] Beiras R, Albentosa M. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Venerupis decussata* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals: implications for the implementation of seawater quality criteria. *Aquaculture.* 2004; 230:205-213.
- [6] Thomas PM, Foster GD. Determination of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Caffeine, and Triclosan in Wastewater by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J Environ Sci Heal A.* 2004; 39:1969–1978.
- [7] Gagné F, Blaise C, André C. Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006; 64:329–336.
- [8] Riba I, Del Valls TA, Forja JM, Gómez-Parra A. Sediment quality in the Atlantic coast of Spain. *Environ Toxicol Chem.* 2004; 48:233-241.
- [9] Weigel S, Berguer U, Jensen E, Kallenborn R, Thorensen H, Huhnerfuss, H. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere.* 2004; 56:583–592.
- [10] Blasco J, Puppo J. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol.* 1999; 122 (2):253–263.

CAPÍTULO 4

- [11] Coelho MR, Langston WJ, Bebianno MJ. Effect of TBT on *Ruditapes decussatus* juveniles. *Chemosphere*. 2006; 63:1499-1505.
- [12] Serafim A, Bebianno MJ. () *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* exposed to cadmium: toxicological effects and bioaccumulation patterns. *Aquat Toxicol*. 2010; 99:370-378.
- [13] Figueira E, Cardoso P, Freitas R. Are metallothioneins equally good biomarkers of metal and oxidative stress? *Comp Biochem Physiol Part C*. 2012; 156:80-86.
- [14] Inoue S, Oshima Y, Usuki H, Hamaguchi M, Hanamura Y, Kai N, et al. Effect of tributyltin maternal and/or waterborne exposure on the embryonic development of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Chemosphere*. 2006; 63:881-888.
- [15] Inoue S, Oshima Y, Usuki H, Hamaguchi M, Hanamura Y, Kai N, Shimasaki Y, Honjo, T. (2007) Effect of tributyltin on veliger larvae of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Chemosphere*. 66, 1353-1357.
- [16] Usero J, González-Regalado E, Gracia I. Trace metals in the bivalve mollusks *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic Coast of Southern Spain. *E I*. 1997; 23:291-298.
- [17] Bebianno MJ, Serafim MA. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve mollusks *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussates*. *Sci Total Environ*. 1998; 214:123-131.
- [18] Chora S, Starita-Geribaldi M, Guignon JM, Samson M, Roméo M, Bebianno MJ. Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. *Aquat Toxicol*. 2009; 94:300-308.
- [19] Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, Del Valls TA. Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. *Environ Pollut*. 2008 b; 151:631-640.
- [20] Martín-Díaz ML, Jiménez-Tenorio N, Sales D, Del Valls TA. Accumulation and histopathological damage in the clam *Ruditapes philippinarum* and the crab *Carcinus maenas* to assess sediment toxicity in Spanish ports. *Chemosphere*. 2008 a; 71:1916-1927.
- [21] Zhang L, Gan J, Ke C, Liu X, Zhao J, You L, et al. Identification and expression profile of a new cytochrome P450 isoform (CYP414A1) in the hepatopancreas of *Venerupis (Ruditapes) philippinarum* exposed to benzo[a]pyrene, cadmium and copper. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012; 33:85-91.

- [22] Li SC, Wang WX, Hsieh DPH. Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. *Mar Environ Res.* 2002; 53:145-160.
- [23] Del Valls TA, Conradi M. Advances in marine ecotoxicology: laboratory tests versus field assessment data on sediment quality studies *Cienc Mar.* 2000; 26:39-64.
- [24] Dellali M, Barelli MG, Romeo M, Aissa P. The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 2001; 130:227-235.
- [25] Moschino V, Dealney E, Da Ros L. Assessing the significance of *Ruditapes philippinarum* as a sentinel for sediment pollution: bioaccumulation and biomarker responses. *Environ Pollut.* 2012; 171:52-60.
- [26] Ramos-Gómez J, Coz A, Viguri JR, Luque A, Martín-Díaz ML, Del Valls TA. Biomarker responsiveness in different tissues of caged *Ruditapes philippinarum* and its use within an integrated sediment quality assessment. *Environ Pollut.* 2011; 159:1914–1922.
- [27] Morales-Caselles C, Martín-Díaz ML, Riba I, Sarasquete C, Del Valls TA. Sublethal responses in caged organisms exposed to sediments affected by oil spills. *Chemosphere.* 2008 b; 72:819-825.
- [28] Morales-Caselles C, Martín-Díaz ML, Riba I, Sarasquete C, Del Valls TA. The role of biomarkers to assess oil-contaminated sediment quality using toxicity tests with clams and crabs. *Environ Toxicol Chem.* 2008 b; 27:1309-1316.
- [29] Martín-Díaz ML. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz; 2004.
- [30] Bebianno MJ. Effects of pollutants in the Ria Formosa Lagoon, Portugal. *Sci Total Environ.* 1995; 171:107-115.
- [31] Rodríguez-Romero A, Jiménez-Tenorio N, Basallote MD, De Orte MR, Blasco J, Riba I. Predicting the Impacts of CO₂ Leakage from Subseabed Storage: Effects of Metal Accumulation and Toxicity on the Model Benthic Organism *Ruditapes philippinarum*. *Environ. Sci. Technol.* 2014; 48:12292-12301.
- [32] Liu X, Zhang L, You L, Cong M, Zhao J, Wu H, et al. Toxicological responses to acute mercury exposure for three species of Manila clam *Ruditapes philippinarum* by NMR-based metabolomics. *Environ Toxicol Phar.* 2011a; 31:323–332.

CAPÍTULO 4

- [33] Zhang L, Liu X, You L, Zhou D, Wu H, Li L, et al. Metabolic responses in gills of Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to copper using NMR-based metabolomics. *Mar. Environ Res.* 2011; 72:33-39.
- [34] Rodrigues ET, Pardal ÂM. The crab *Carcinus maenas* as a suitable experimental model in ecotoxicology. *Environ. Int.* 2014; 70:158-182.
- [35] Hill WR, Wyse GA. Ed. Médica Panamericana; 2004.
- [36] Almeida Â, Calisto V, Esteves VI, Schneider RJ, Soares AM, Figueira E, Freitas R. Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems: Effects on bivalves. *Aquat Toxicol.* 2014; 156:74-87.
- [37] Gago-Tinoco A, González-Domínguez R, García-Barrera T, Blasco-Moreno J, Bebianno, MJ, Gómez-Ariza JL. () Metabolic signatures associated with environmental pollution by metals in Doñana National Park using *P. clarkii* as bioindicator. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2014; 21(23):13315-23.
- [38] Rubin LF. Toxicological update of dimethylsulfoxide. *Annals NY Academy Sci.* 1983; 411:6-10.
- [39] Sanderson H, Thomsen M. Ecotoxicological quantitative structure activity relationships for pharmaceuticals. *Bull. Environ. Toxicol. Chem.* 2007; 79:331–33.
- [40] Sanderson H, Thomsen, M. (2009) Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system for chemicals. Assessment of the (Q)SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicity and their predominant acute toxic mode-of-action. *Toxicol Lett.* 187, 84–93.
- [41] Escher BI, Eggen RIL, Schreiber U, Schreiber Z, Vye E, Wisner B, et al. Baseline toxicity (narcosis) of organic chemicals determined by In Vitromembrane potential measurements in energy-transducing membranes. *Environ. Sci Technol.* 2002; 36:1971–1979.
- [42] Escher BI, Bramaz N, Eggen RIL, Richter M. In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceuticals in aquatic life. *Environ. Sci. Technol.* 2005; 39:3090–3100.
- [43] Contardo-Jara V, Lorenz C, Pflugmacher S, Nützmann G, Kloas W, Wiegand C. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 2011; 105:428– 437.

- [44] Gravel A, Wilson JM, Pedro DFN, Vijayan MM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs disturb the osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with seawater exposure in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol Part C*. 2009; 149:481–490.
- [45] Donato MT, Gomez-Lechon MJ. Drug-induced liver steatosis and phospholipidosis: cell-based assays for early screening of drug candidates. *Curr. Drug Metab*. 13(8), 1160-1173.
- [46] Martin-Diaz L, Franzellitti S, Buratti S, Valbonesi P, Capuzzo A, Fabbri E. Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*. 2009; 94:177–185.
- [47] Li ZH, Zlabek V, Velisek J, Grabic R, Machova J, Kolarova J, Li P, Randak T. Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 2011; 74:319–327.
- [48] Liu X, Zhang L, You L, Yu J, Cong M, Wang Q, Li F, Li L, Zhao J, Li C, Wu H. Assessment of clam *Ruditapes philippinarum* as heavy metal bioindicators using NMR-based metabolomics. *Clean-Soil, Air, Water*. 2011b; 39 (8):759–766.
- [49] Zhang L, Liu X, You L, Zhou D, Wang Q, Li F, et al. Benzo(a)pyrene-induced metabolic responses in Manila clam *Ruditapes philippinarum* by proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) based metabolomics. *Environ Toxicol Pharm*. 2011; 32:218–225.
- [50] De Zwaan A, Kluytmans JH, Zandee DI. Facultative anaerobiosis in mollusks. *Biochem Soc Symp*. 1976; 41:133–168.
- [51] Soldatov AA, Andreenko TI, Golovina IV, Stolbov AY. Peculiarities of organization of tissue metabolism in mollusks with different tolerance to external hypoxia. *J Evolut Biochem Physiol*. 2010; 46(4):341-349.
- [52] Li ZH, Velisek J, Zlabek V, Grabic R, Machova J, Kolarova J, et al. Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. *Chem Biol Interact*. 2010; 183:98–104.
- [53] Waarde A. Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic production. *Comp Biochem Physiol*. 1988; 91B:207–228.

CAPÍTULO 4

[54] Liu X, Zhang L, You L, Yu J, Zhao J, Li L, et al. Differential toxicological effects induced by mercury in gills from three pedigrees of Manila clam *Ruditapes philippinarum* by NMR-based metabolomics. *Ecotoxicology*. 2011c; 20:177–186.

[55] Wu H, Liu X, Zhao J, Yu J. NMR-based metabolomic investigations on the differential responses in adductor muscles from two pedigrees of manila clam *Ruditapes philippinarum* to cadmium and zinc. *Mar Drug*. 2011; 9:1566-1579.

[56] Viant MR, Eric S, Rosenblum ES, Tjeerdema RS. Optimized method for the determination of phosphoarginine in abalone tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2001; 765:107–111.

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Jaula para estabulación de organismos (fotografía izquierda) y ensayos de toxicidad en laboratorio (fotografía centro y derecha). Especie: *Ruditapes philippinarum*.

Figura 2. Diseño de exposición: representación cronológica de los puntos de muestreo.

Figura 3. Gráficos de “scores” de PLS-DA teniendo en cuenta los diferentes subgrupos del estudio, el análisis en modo positivo de extractos polares en glándulas digestivas.

Figura 4. Gráficos de “scores” de PLS -DA teniendo en cuenta el tiempo de exposición en modo positivo de extractos polares de las glándulas digestivas de especímenes expuestos a la carbamazepina y grupo de control.

Figura 5. Gráficas de “scores” considerando los análisis de PLS -DA en el modo positivo de extractos polares en glándulas digestivas expuestas a corto plazo a carbamazepina vs grupo de control (A) y glándulas digestivas expuestas a largo plazo a carbamazepina vs grupo de control (B).

Figura 6. Representación esquemática de las rutas metabólicas en las que se ven implicados los metabolitos alterados por inducción de fármacos (ibuprofeno, carbamazepina y diclofenaco) en las glándulas digestivas (A) y branquias (B) de *R. philippinarum*.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Biomarcadores de toxicidad inducida por fármacos, aumento (↑) o disminución (↓) de la expresión en las muestras expuestas vs grupo de control.

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten alcanzar las siguientes conclusiones:

1. Los invertebrados usados para estudios de contaminación ambiental y de exposición a fármacos, son buenos bioindicadores para evaluar la respuesta biológica de organismos acuáticos a contaminantes emergentes. Se ha demostrado, asimismo, la idoneidad de los órganos diana utilizados en cada caso (fundamentalmente glándula digestiva u branquias) para obtener una respuesta adecuada.

2. Se ha estudiado la presencia de metales pesados en organismos acuáticos en la zona del suroeste de la Península Ibérica, considerando ecosistemas costeros y estuarinos, utilizando como bioindicadores moluscos y crustáceos, comprobándose la presencia de contaminación diferencial en distintas zonas con diferente tipo de contaminación, incluyendo áreas del interior del PND utilizadas como control. Los resultados más importantes se obtienen para el Cu, Zn, As, Fe y Cd en glándula digestiva, revelando claramente, que la contaminación por metales es mayor en zonas del entorno de Doñana. Los niveles más elevados de contaminación se encontraron en la zona de MAT, probablemente debido al vertido de residuos mineros en 1998 de la mina de Aznalcóllar, pudiendo destacarse los altos niveles de Cu en glándula digestiva.

3. La aplicación del procedimiento metalómico desarrollado mediante el acoplamiento de la cromatografía de exclusión de tamaño con un sistema de detección atómica ICP-MS, para la caracterización de especies metálicas en *Scrobicularia plana* y *Procambarus clarkii*, proporciona una herramienta analítica útil para la evaluación de la respuesta biológica a contaminantes en organismos que habitan entornos naturales amenazados como estuarios del río Arade y Guadiana, y Ria Formosa (en Portugal), y Parque Nacional de Doñana y sus alrededores, y estuarios del Guadalquivir y Parque Natural del Caño de Sancti-Petri (en España).

4. Los perfiles de metalobiomoléculas obtenidos a partir de los extractos de glándula digestiva de *Scrobicularia plana* de las zonas de Cádiz y Algarve, muestran varias biomoléculas unidas a diferentes metales, destacando en todas ellas la importante presencia de Cu, Zn y As. Se observa la presencia de biomoléculas de Cu- Zn- de baja masa molecular, con un tiempo de retención que coincide con el de la GSH, por lo que podría estar unido a estos metales. Sin embargo, estos resultados no se observan en los perfiles de la zona de Cádiz. La respuesta de biomoléculas de Cu- Zn- de baja masa molecular es más marcada en el área de Portugal que en la de Cádiz. El pico relacionado con el tiempo de retención de GSH también se encuentra en los perfiles cromatográficos de As, que puede relacionarse con la presencia de metabolitos de este elemento, como arsenobetaina y arsenocolina tanto en las zonas de Portugal como de Cádiz.

CONCLUSIONES GENERALES

5. Los perfiles de metalobiomoléculas obtenidos a partir de los extractos de glándula digestiva de *Procambarus clarkii* del PND y alrededores, muestran varias biomoléculas unidas a diferentes metales, destacando en todas ellas la importante presencia de Cu, Zn y As. Se observa la sobreexpresión de proteínas relacionadas con el estrés ambiental causado por metales, como las metalotioneinas que contienen Cu y Zn en la glándula digestiva de *P. Clarkii*, especialmente en MAT, hecho que correlaciona con la mayor concentración de estos elementos en los tejidos de *P. clarkii*. Del mismo modo, también se observa una mayor presencia de As-biomoléculas en MAT. , Además, se aprecia sobreexpresión de otras biomoléculas que contienen Zn, las cuales se relacionan con el estrés oxidativo como la Zn-GSH. La presencia de otros metales tóxicos como As en estas zonas contaminadas origina la presencia de metabolitos de baja masa molecular (100-300 Da) que contienen As, cuya especiación en glándula digestiva mediante HPLC-(IEC)-ICP-MS confirma el carácter crítico de MAT. Asimismo, se han encontrado picos trazados por As pero de estructura desconocida en las zonas contaminadas y no contaminadas que coinciden con el tiempo de retención descrito en la bibliografía para la arsenocolina. En zonas no contaminadas, como LDP, los perfiles de todas estas metalobiomoléculas en glándula digestiva, músculo y branquias se reducen de manera considerable, probablemente debido a la ausencia de contaminantes que provoquen su sobreexpresión.

6. El estudio de biomarcadores bien establecidos, MTs y LPO muestra que existen alteraciones en la LPO en la glándula digestiva de los cangrejos de río, relacionadas con deterioro oxidativo debido a un desequilibrio entre la tasa fisiológica de la producción de oxidantes y el tiempo de respuesta de defensa antioxidante. Además, la sobreexpresión de MT también se relaciona con procesos de deterioro oxidativo en las zonas contaminadas.

7. El estudio metabólico de las zonas en estudio (mediante el empleo de espectrometría de masas en tándem ESI-QqTOF) permite una diagnosis inequívoca de la situación ambiental de las mismas, que con el complemento de los resultados metalómicos y de especiación en *S. plana* y *P. Clarkii*, hace posible disponer de una herramienta poderosa para el diseño de biomarcadores de estrés medioambiental.. En este sentido, ha sido posible establecer alteraciones metabólicas asociadas a la respuesta toxicológica, como el estrés oxidativo y la disfunción energética, que se relacionan con la alteración en los niveles de fosfolípidos y su degradación, así como cambios en los niveles de fosfolípidos, glucosa, alanina, arginina, o diferentes vitaminas, entre otros. Se ha demostrado el impacto que los contaminantes metálicos tienen en el metabolismo de *P. clarkii* que constituye un buen bioindicador de contaminación, pero aún se precisan estudios complementarios para comprender las respuestas de estos organismos de vida libre a un solo metal, o a otros contaminantes, así como la cuantificación de metabolitos identificados como biomarcadores.

8. El estudio de la respuesta biológica por ESI-QqTOF-MS/MS en el bivalvo *Ruditapes philippinarum* sometido a experiencias de exposición a diferentes fármacos (ibuprofeno, carbamazepina y diclofenaco), utilizando concentraciones subletales en condiciones de laboratorio controladas, permite mimetizar los escenarios naturales donde se encuentran los organismos, y de esta forma identificar los metabolitos que se alteran, y las rutas bioquímicas celulares relacionadas, así como, comprender los procesos bioquímicos asociados a la toxicidad de los fármacos. Se observa que hay una inducción de metabolitos relacionados con efectos adversos dependiente del tiempo de exposición y que los cambios metabólicos inducidos por fármacos son comunes para los tres compuestos probados, lo que puede estar relacionado con su modo no específico de acción tóxica (MoA) sobre los organismos. Las alteraciones metabólicas no se deben a la bioactividad de los compuestos farmacéuticos, sino a su acción mediante procesos de narcosis, por lo que la interpretación bioquímica de los resultados se puede generalizar a las tres experiencias de exposición. Por otro lado, los cambios metabólicos en glándula digestiva, están relacionados con hiperlipidemia o alteración en el metabolismo hepático de las grasas, así como la alteración de la homeostasis de aminoácidos y ácidos orgánicos. En glándula digestiva y branquias se ha encontrado desregulación en los niveles de lípidos, en el intervalo de m / z de 650-850 para fosfolípidos y de 250-300 para los ácidos grasos libres. Se aprecia claramente que los fármacos perturban el metabolismo energético y causan estrés metabólico, en este sentido, la hipoxia inducida por el estrés ambiental originado conduce a anaerobiosis. En este sentido, la marcada presencia de alanina y succinato, que constituyen los principales productos finales de la descomposición anaerobia de la glucosa en los bivalvos, así como la presencia de niveles elevados de lactato, puede asociarse a trastornos del ciclo de la energía. También se observa una situación de hiperamonemia, como consecuencia del metabolismo anaeróbico en la célula, inducido por una mayor demanda de energía, que es debido a la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa, y la sobreexpresión de alanina y de aspartatoaminotransferasas, que se asocian al aumento en los niveles de aspartato y glutamato en glándula digestiva, junto con una disminución de glutamina, debido al proceso activado de desaminación de aminoácidos. Además, el aumento observado de arginina y ATP sugiere una disfunción energética. De esta manera, los niveles elevados de arginina en glándula digestiva pueden ser considerados como un marcador complementario de trastornos energéticos. Respecto a las branquias, la acumulación de lípidos y la disminución de la betaína están asociadas a respuestas como la dislipidemia y perturbaciones de la regulación osmótica, respectivamente. Por otro lado, la urea y la guanidina son los principales metabolitos implicados en la homeostasis del amoníaco, por lo que su incremento refleja el proceso de hiperamonemia debido a la desaminación de aminoácidos y el exceso de activación de las transaminasas.