

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



Biomarcadores en cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) para evaluar la contaminación del Parque de Doñana y el Estuario del Guadalquivir por metales y plaguicidas

Amalia Vioque Fernández

Tesis Doctoral. 2008

TITULO: *BIOMARCADORES EN CANGREJO DE RÍO (PROCAMBARUS CLARKII) PARA EVALUAR LA CONTAMINACION DEL PARQUE DE DONANA Y EL ESTUARIO DEL GUADALQUIVIR POR METALES Y PLAGUICIDAS*
AUTOR: *AMALIA VIOQUE FERNANDEZ*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2009
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-7801-929-8
D.L.: CO-188-2009

Introducción

I. CONTAMINACIÓN DE LOS ECOSISTEMAS FLUVIALES

La contaminación es una gran amenaza para los ecosistemas. Las grandes catástrofes, vertidos accidentales al mar o los ríos, y la exposición prolongada a contaminantes causan efectos dañinos en los seres vivos. De hecho, muchas enfermedades están ligadas a contaminantes. Las actividades antropogénicas provocan estrés en los ecosistemas, liberan contaminantes, afectan la supervivencia de los organismos, perturban la estructura y función de los ecosistemas naturales, modificando el número de especies (introducen especies exóticas o eliminan otras nativas), su acervo genético y la diversidad de ecosistemas y hábitats naturales (Steinberg et al., 1994).

El uso de los ecosistemas fluviales como fuente de recursos y vía de eliminación de residuos ha provocando su degradación. La producción de residuos, introducción de nuevos plaguicidas y fertilizantes en la agricultura intensiva, aumento y concentración de población en ciudades, regulación de cauces, actividades mineras, etc. aumentan la suma de contaminantes persistentes en el agua y la enriquecen en nutrientes, disminuyendo la calidad de los ecosistemas fluviales y de las comunidades que los habitan (Calamari, 2002; Marchini, 2002).

Los contaminantes llegan a los ecosistemas por tres rutas (Walker et al., 1997): i) Liberación “no intencionada” (accidentes, catástrofes, etc.); ii) Aguas residuales y efluentes industriales; iii) Aplicación de biocidas, cuyos residuos son transportados desde suelos agrícolas tratados por escorrentías, principal transporte de plaguicidas en ambientes acuáticos (Ritter et al., 2002; Huang et al., 2004). Los plaguicidas pueden permanecer en el agua, fijarse por adsorción a las partículas del suelo o ser absorbidos por los organismos y acumularse a través de las cadenas tróficas poniendo en riesgo las personas que los consumen (Hodgson, 2004; Montforts, 2006).

El seguimiento medioambiental permite detectar qué ecosistemas están contaminados, los contaminantes implicados y sus fuentes, y evaluar sus efectos en los seres vivos (Galloway et al., 2002). La medida del impacto del desarrollo tecnológico en la calidad ambiental requiere estudiar los efectos de los contaminantes en organismos indicadores, **bioindicadores**. Éstos responden a xenobióticos y predicen el 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 (López-Barea and Pueyo, 1998; Rodríguez-Ortega et al., 2003). Los crustáceos han sido usados como bioindicadores de contaminación en ambientes acuáticos (O'Neill et al., 2004; Hagger et al., 2005).

I.1 TIPOS DE CONTAMINANTES

Muchos contaminantes son **xenobióticos**, compuestos extraños a los seres vivos que se incorporan a sus rutas bioquímicas (Livingstone, 1992; Walker et al., 1997). Desde la 2ª Guerra Mundial, ha habido 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) (Manahan, 2000). La EPA (Environmental Protection Agency) estima que hay >100.000 especies químicas en uso, de los que 11.000 se producen en cantidades que amenazan los ecosistemas, y al año se introducen ~1.500 nuevas (Steinberg et al., 1994). Además, compuestos naturales, como cafeína, heroína, penicilina, etc., y productos del metabolismo, como etanol, acetaldehído, formaldehído, ácido úrico, hormonas, y sustancias esenciales como los metales pesados (Cu, Zn, etc.), se consideran xenobioticos si su concentración excede los límites naturales (Hansen and Shane, 1994). Los contaminantes pueden clasificarse en inorgánicos y orgánicos (Tabla 1.).

Tabla 1. *Principales tipos de contaminantes en el agua y sus fuentes.*

Tipo de contaminante	Fuente
Contaminantes inorgánicos	
Metales	Industria, minería
Compuestos organometálicos	Puertos, pinturas
Radionucleidos	Centrales nucleares
Asbestos	Industria
Contaminantes orgánicos	
Bifenilos policlorados	Industria
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Industria, actividades petrolíferas
Plaguicidas	Agricultura
Aguas fecales	Zonas urbanas, granjas
Detergentes	Industria, zonas urbanas
Sedimentos	Industria, minería, zonas urbanas

I.2 PLAGUICIDAS

Los plaguicidas son un problema ambiental especial pues se introducen a propósito en el ambiente con fines beneficiosos. Aunque su uso protege las cosechas, los bosques y la salud, son una amenaza potencial para el ambiente y los organismos. Por su naturaleza química y mecanismo de acción se clasifican en, organoclorados, piretrinas, organofosforados (OPs) y carbamatos (CMs).

Aunque se han utilizado desde ~2500 AC, el desarrollo de los OPs comenzó antes de la 2ª Guerra Mundial, cuando el Ministerio de Defensa alemán desarrolló agentes químicos de guerra, compuestos OPs muy tóxicos (tabun, satén, y soman) (Manahan, 2000). Aunque los OPs son menos tóxicos que los agentes nerviosos (sarin utilizado en Iraq en 1988 y ataques en el metro de Tokio en 1995), su modo de actuación es semejante. Tras comprobar su utilidad como plaguicidas, se sintetizaron miles de OPs más selectivos y menos tóxicos para su uso como insecticidas. Los CMs se originaron antes que los OPs, en 1860 se aisló fisostigmina (alcaloide de la eserina) de *Physostigma venenosum* (*haba de calabar*) usada en el tratamiento del glaucoma. Más tarde, se sintetizó la neostigmina, éster aromático del ác. carbámico, para el tratamiento de la miastenia grave. En los años 60 y 70 el carbaryl comenzó a usarse como plaguicida. Hoy los plaguicidas son una necesidad económica (parte integral de la agricultura moderna) y de salud pública (uso contra vectores de la malaria, virus del Nilo, etc). En 1960 se produjo un cambio en el uso de plaguicidas, desde los organoclorados (como el DDT), muy estables y persistentes hacia los OPs y CMs (Keiding, 1960). La prohibición del uso de los organoclorados, convirtió a OPs y CMs en los plaguicidas más usados (insecticidas, nematocidas, herbicidas, fungicidas, plastificantes, gases nerviosos) por su baja persistencia en el ambiente, menor bioacumulación, acción rápida y menor resistencia desarrollada en insectos que a los organoclorados (Winteringham, 1969). Sin embargo, la aplicación sistemática de estos compuestos, y los vertidos accidentales durante su manufactura y/o distribución, causan su liberación al ecosistema afectando a los seres vivos (Kunz and Kemp, 1994). Además, la población está expuesta a OPs y CMs en sus hogares, lugares de trabajo, o a través de los alimentos (Peshin et al., 2002).

Desde los 80, OPs y CMs se usan para múltiples propósitos, plaguicidas (protección de cosechas y del grano), y los de menor potencial inhibidor de esteroides se usan en medicina veterinaria, como parainsecticidas (ecto-/endo-parasiticidas), y humana (enfermedades neurodegenerativas, Alzheimer, miastenia grave, glaucoma, y como profilácticos contra el envenenamiento por agentes nerviosos). El desarrollo de OPs y

CMs continuará al descubrirse nuevos usos para estos compuestos (Taylor, 1998; Valle et al., 2008). Aunque los CMs se usan más que los OPs, más tóxicos, inhibidores irreversibles de esterasas e inductores de neuropatía, algunos CMs, como aldicarb y carbofuran, son muy tóxicos, como se vió en el desastre de Bhopal en 1984 por exposición a metilisocianato (Dhara and Dhara, 2002) o la intoxicación en California en 1985 por melones contaminados con aldicarb (Goldman et al., 1990).

Los plaguicidas afectan a organismos no diana y causan desequilibrios en los ecosistemas, y en los organismos, cambios de comportamiento, y reducción de su supervivencia, crecimiento ó reproducción (Malins and Ostrander, 1991). Además, los organismos pueden bioacumularlos exponiéndose así a concentraciones superiores a las existentes en el ambiente (Hodgson, 2004; Montforts, 2006). Por ello, la determinación de su contenido en agua y sedimentos, no informa de su disponibilidad y efecto en los organismos, haciendo necesario el uso de bioindicadores, organismos centinela, para tener información completa sobre su efecto en los seres vivos y el nivel de contaminación de los ecosistemas donde habitan. La OMS estima que ~3 millones de personas sufren anualmente envenenamiento agudo por plaguicidas.

Los plaguicidas causan muchos efectos toxicológicos en el sistema nervioso, estrés oxidativo y carcinogénesis. La toxicidad aguda de OPs y CMs se debe a la inhibición de la acetilcolinesterasa (**AChE**; EC 3.1.1.7), que hidroliza acetilcolina (ACh) en sinapsis neuronales y neuromusculares, aumentando el nivel de ACh en el espacio intersináptico (Pope, 1999; Casida and Quistad, 2004). La butirilcolinesterasa (**BuChE**; EC 3.1.1.8) y otras Ser-hidrolasas, carboxilesterasas, tripsina, o quimotripsina, también son inhibidas por ellos. Aunque su inhibición no parece tener un efecto adverso específico, suele usarse como medida de exposición a plaguicidas (Reiner et al., 2000). La exposición a OPs y CMs puede revelarse midiendo varias actividades esterasas. Dado que su sensibilidad a plaguicidas varía con la especie y el tipo de plaguicida, la medida conjunta de varias esterasas informa más sobre la exposición a OPs o CMs (Sogorb and Vilanova, 2002; Walz and Schwack, 2007). Para usar las esterasas como biomarcadores sensibles a plaguicidas hay que caracterizar la especie bioindicadora y poner a punto el ensayo de su actividad (Sanchez Hernandez and Sanchez, 2002; Vioque-Fernandez et al., 2007b).

No todos los efectos tóxicos de los plaguicidas se pueden atribuir a la inhibición de la AChE, y son distintos para cada uno (Pope, 1999; Li et al., 2005). Cada plaguicida reacciona con otros blancos, además de la AChE, que contribuyen a su toxicidad. La identificación de nuevos biomarcadores de exposición a plaguicidas (p.ej. aproximaciones

proteómicas) ayudaría a su diagnosis y podría tener aplicaciones terapéuticas. Se estima que sólo se han identificado una pequeña fracción de las proteínas que reaccionan con los plaguicidas y que otras muchas reaccionan *in vivo* a dosis que no causan toxicidad.

Hemos caracterizado las actividades AChE, BChE y CbE en glandula digestiva, músculo y tejido nervioso del cangrejo de río *Procambarus clarkii*. También estudiamos su distribución y sensibilidad, *in vitro* e *in vivo*, a varios OPs y CMs y otros inhibidores generales de Ser-hidrolasas (PMSF) y específicos de BChE (iso-OMPA) (Vioque-Fernandez et al., 2007a; Vioque-Fernandez et al., 2007b). Esto permite establecer una relación dosis-respuesta para estas enzimas, en *P. clarkii*, previas a su uso en la monitorización de Doñana.

I.2.1 Organofosforados

Término genérico que incluye todos los compuestos orgánicos que contienen fósforo. Los OPs son esterés derivados de los ácidos (tio)-fosfórico, fosfónico y fosfínico. Aunque algunos tienen alta toxicidad, incluso mayor que los organoclorados, se les considera más aceptables para el medio ambiente, por su escasa estabilidad y bioacumulación (Walker, et al., 1997; Barrenetxea et al., 2003). La mayoría son liposolubles, lo que favorece su penetración; son poco volátiles, con algunas excepciones (ej., diclorvos); y se degradan por hidrólisis, especialmente en condiciones alcalinas.

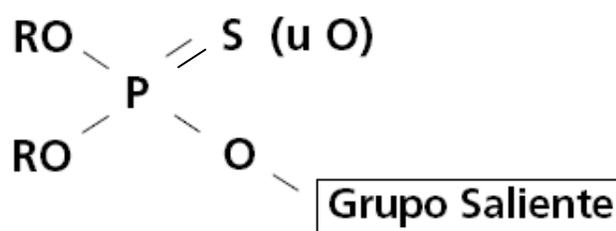
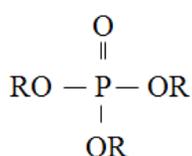


Fig.1. Estructura química general de los OPs. R puede ser un alquilo, alcoxi, ariloxi, amido u otros (en general, R simboliza un grupo etilo o metilo) y el grupo saliente puede ser un haluro, fenoxi, tiofenoxi, fosfato, carboxilato, etc.

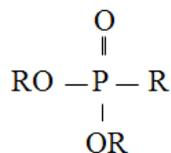
Los OPs tienen un átomo de P y un enlace fosforilo (P=O) o tiofosforilo (P=S). En general, tienen dos sustitutos alquilo y otro, más labil a la hidrólisis. Los fosfonatos tienen alquilo (-R) en lugar de alcoxi (-RO) (Marrs, 1993). Los **oxones**, con O unido con doble enlace al P, son potentes inhibidores de AChE y otras esterasas pero se hidrolizan mejor, especialmente en medio alcalino. Para hacerlos más resistentes a hidrólisis y prolongar su

vida media en el ambiente, muchos tienen S (P=S) en vez de O. Estos se denominan **tionos** (organotiofosfatos) y aunque deben ser activados (desulfurados/oxidados) a su forma oxon para inhibir las esterasas, penetran mejor las membranas. En el ambiente, los tionos se activan por acción del O₂ y la luz, y en el organismo por monooxigenasas microsomales. Así, la inhibición de las ChEs por exposición a un OP ocurre por acción de su forma oxon y no de los compuestos originales de S. La mayor electronegatividad del O comparado al S, confiere a los oxones mayor capacidad de inhibir las Ser-hidrolasas.

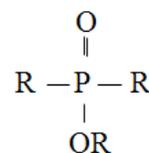
Los OPs tienen gran complejidad debido al tipo de cadenas laterales unidas al P. Basándose en las cadenas laterales y otros elementos unidos al P, se clasifican en 13 tipos (Marrs, 1993).



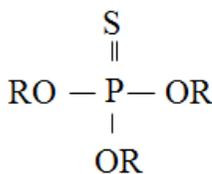
Fosfatos



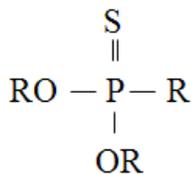
Fosfonatos



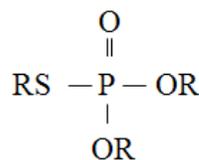
Fosfinatos



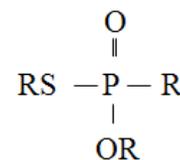
Fosfortioatos



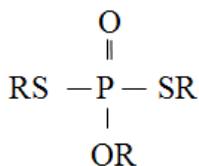
Fosfontionatos



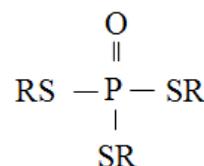
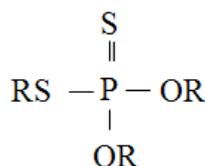
Fosfortioato
(S-sustituido)



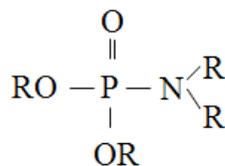
Fosfontioatos
(S-sustituido)



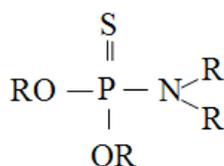
Fosforoditioatos



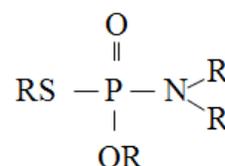
Fosfortritioatos

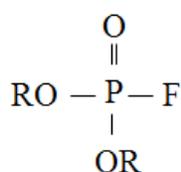


Fosformaidatos

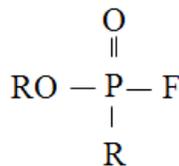


Fosforamidotioatos



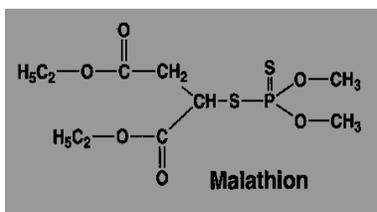


Fosforofluoridatos

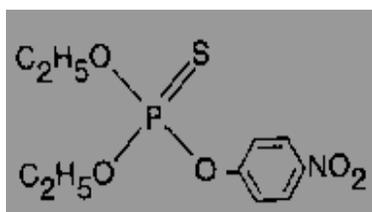


Fosfornofluoridatos

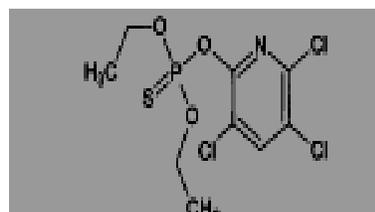
Fig.2. Clasificación general de los OPs.



Malation (O,O-dimetil S-1,2-bis (carboxietil) fosforoditionato)



Paration(O,O-dietil O-4-nitrofenil fosforotioato)



Clorpirifos(0,0-diethyl-0-(3,5,6-trichloropyridia-2-yl) thiophosphate)

Fig.3. Ejemplos de OPs de uso general.

I.2.2 Carbamatos

Ésteres de los ácidos N-metil o dimetil carbámico. Como los OPs, son poco persistentes en el ambiente y poco bioacumulables y se hidrolizan fácilmente en medio alcalino (Walker et al., 1997).

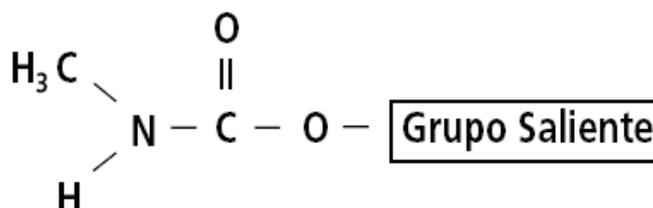


Fig.4. Estructura química general de los CMs.

La estructura de los CMs es menos compleja que la de los OPs. Algunos se parecen a la acetilcolina (ACh) y estimulan sus receptores, además de inactivar algunas esterasas (Kidd and James, 1991; Tomlin, 1997).

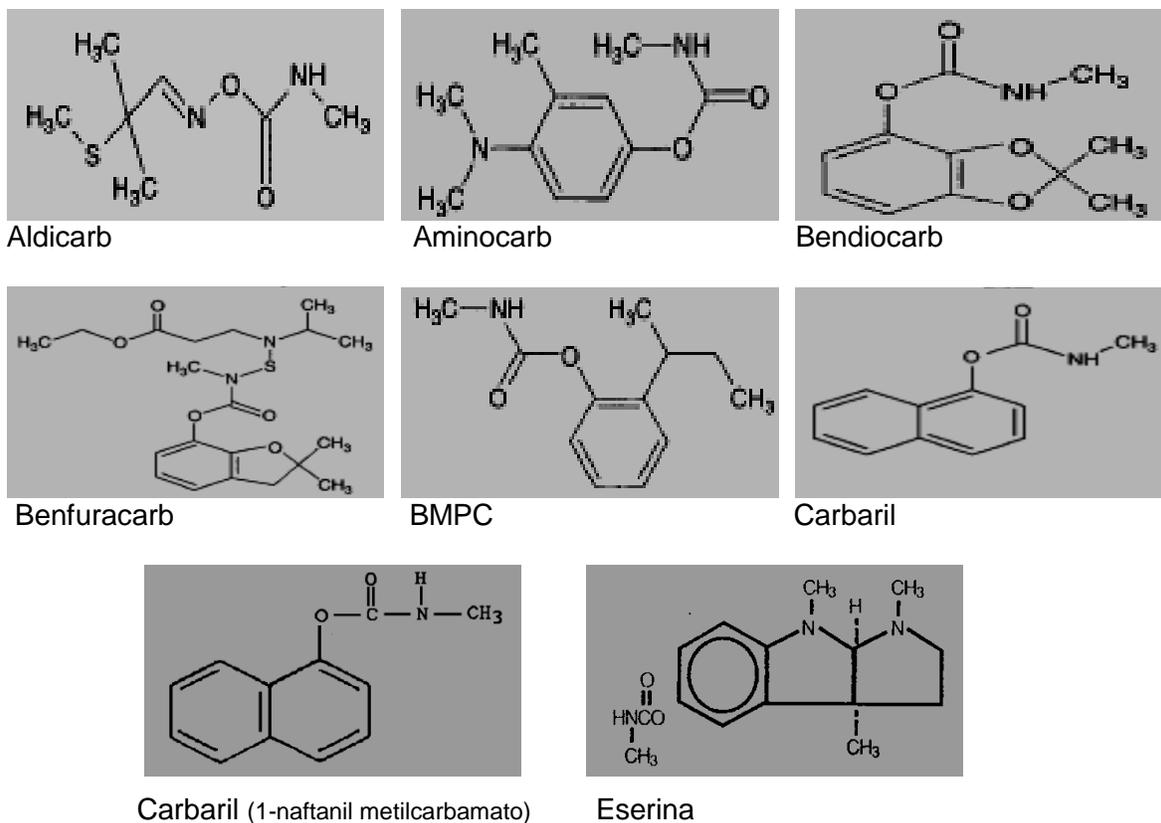


Fig.5. *Ejemplos de CMs de uso general.*

Los CMs causan la carbamitación e inhibición reversible de algunas esterasas, más lábiles que la forma fosforilada producida por OPs.

1.2.3 Organoclorados

Se caracterizan por su baja solubilidad en agua y gran liposolubilidad, lo que les confiere alta persistencia en el ambiente y bioacumulabilidad.

La principal acción tóxica de los OCs es la sobreexcitación del sistema nervioso. Además, altos niveles de DDT, DDE o ciclodienos inducen monooxigenasas hepáticas (Hunter et al., 1972). Aunque la EPA prohibió el uso de muchos OCs (DDT, aldín, dieldrín, heptacloro, mirex, clordecona y clordano) (Keiding, 1960), algunos son ingredientes activos de productos muy usados (hexaclorobenceno usado como fungicida, hexaclorociclohexano incluye el lindano).

Estructuras químicas generales de los organoclorados (Fig.6).

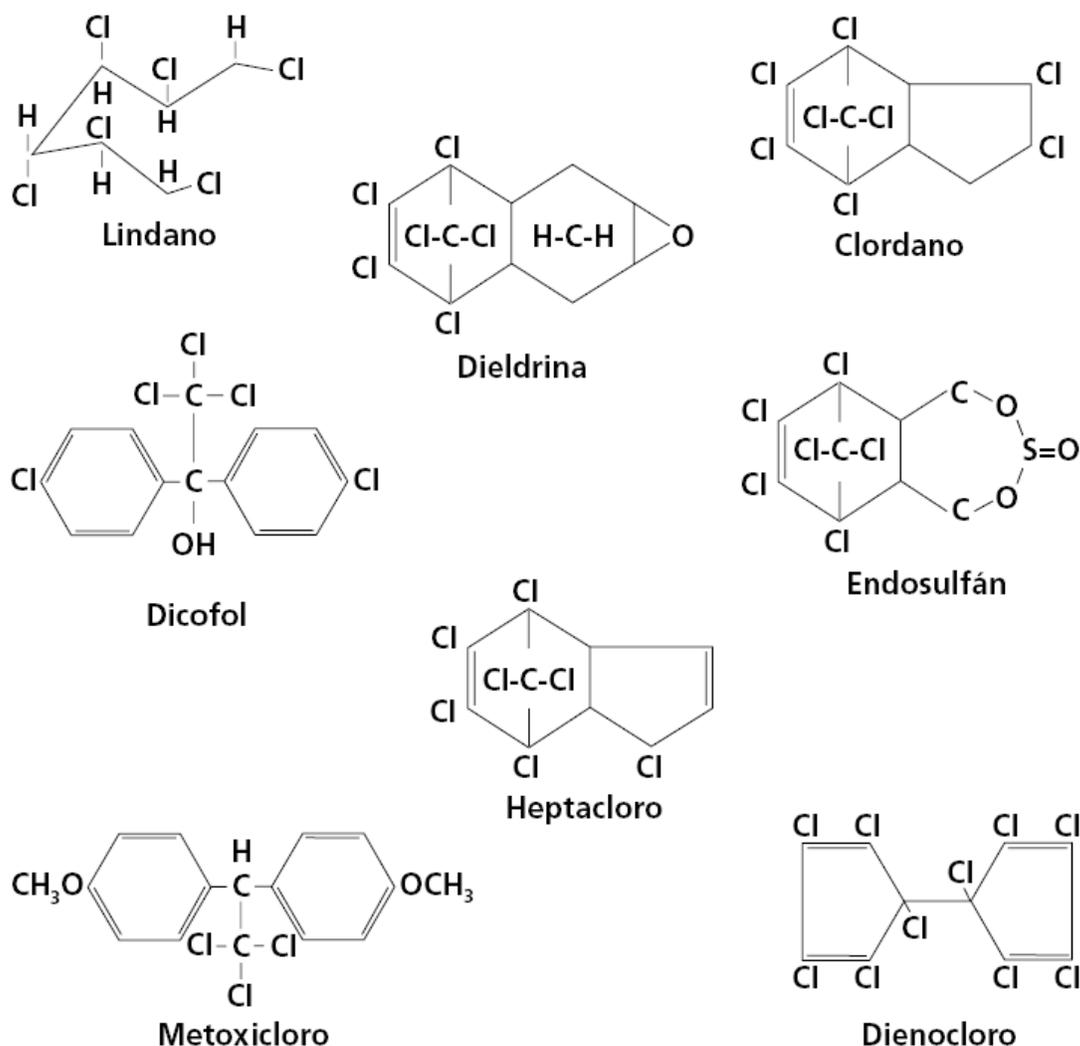


Fig.6. Clasificación general de los OCs.

1.2.4 Otros plaguicidas

Muchos plaguicidas no encajan en ninguna clasificación, son de uso extensivo y su toxicidad podría afectar a los seres vivos.

Piretroides, insecticidas sintéticos derivados de las piretrinas naturales (ésteres de los ácidos crisantémico y piretroico), pero más estables para su uso agrícola y en el tratamiento de enfermedades por ectoparásitos. Normalmente, se combinan con otros plaguicidas, como el butóxido de piperonilo, la noctil-biciclohepten-dicarboximida, OPs y CMs. Aunque la mayoría son poco tóxicos debido a su limitada absorción, rápida biodegradación y excreción de los metabolitos derivados, algunos son muy neurotóxicos.

Acido bórico y boratos, larvicidas usado en las extensiones ganaderas.

Clorobencilato (acaricida), hidrocarburo clorado similar al DDT, aunque más excretable, como derivados de benzofenona y ácido benzoico. No inhibe la AChE.

Cihexatín, hidróxido de triciclohexil estaño, usado en control de ácaros en frutales.

Azufre (acaricida y fungicida), se mezcla con otros minerales para mejorar su fluidez.

Cianamida cálcica (fertilizante, fungicida y herbicida), inhibe la catalasa y acetaldehído deshidrogenasa. La cianamida se libera en condiciones acídicas.

4-aminopiridina (repelente de aves), aumenta la liberación de ACh.

Metales pesados, derivados de industrias y minas. Muchos se bioacumulan (Ringwood et al., 1999) y causan estrés oxidativo (Lopez-Barea, 1995), El As se une a proteínas e inhibe la síntesis de ATP (Gebel, 2000). Los organoestánicos (bactericidas, fungicidas, insecticidas) son muy tóxicos (Manahan, 2000).

Bifenilos policlorados usados como dieléctricos, lubricantes, hidráulicos, retardantes de llama, y plastificantes (Livingstone et al., 1992). Por su baja solubilidad en agua y toxicidad fue prohibido su uso en 1977 (Calambokidis and Francis, 1994).

Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Derivados de la combustión incompleta de carburantes y vertidos industriales. Son poco solubles en agua y se bioacumulan en los invertebrados acuáticos (Livingstone et al., 1992; Walker et al., 1997). Muchos son biotransformados a potentes carcinógenos, (Timbrell, 2001).

II. BIOINDICADORES: *PROCAMBARUS CLARKII*

Son especies centinelas usadas para detectar la presencia de contaminantes, estimar sus efectos y predecir los riesgos derivados (Livingstone, 1993; Peakall, 1994; Lopez-Barea, 1995). Un bioindicador ideal debe tener amplia distribución geográfica, ser de fácil muestreo, sésil/semisésil o vivir en un territorio restringido, y ser bien conocido a nivel bioquímico y fisiológico (Lowe and Kendall, 1990). Los crustáceos se usan como bioindicadores por su gran plasticidad ecológica, capacidad de alterar sus funciones fisiológicas y bioquímicas para sobrevivir en presencia de contaminantes y amplia distribución. Además, depuran y eliminan los metales pesados acumulados en sus tejidos (Naqvi et al., 1990; Madigosky et al., 1991).

El cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii*, Arthropoda, Crustacea, Decapoda, Cambaridae), es una especie exótica introducida en el Bajo Guadalquivir (Habsburgo-Lorena, 1986). Vive en sustratos blandos de ríos, marismas y charcas, excavando túneles de refugio. Alcanza 10 cm del rostro al telson, su coloración varía de

rojiza a gris azulada y es omnívoro. En otoño, tras la fecundación, la hembra se entierra y pone los huevos (~100) que quedan pegados a sus pleópodos. En primavera aparecen pequeños cangrejos sin pasar por estadios intermedios, a diferencia de otros crustáceos. *P. clarkii* tiene una fisiología muy resistente, tolera niveles bajos de O₂ disuelto (2-14mg/l), cambios de temperatura (17-22°C), y alta contaminación, lo que le hace muy útil como bioindicador. De hecho, es la especie más plástica y ubicua de todos los Decápodos y ajusta su ciclo de vida al régimen hídrico, anual (<4 meses de inundación) o constante (12 meses de inundación) (Moody et al., 1993; Gutierrez-Yurrita and Montes, 1998).

Además de ser una especie invasora, *P. clarkii* modifica los ecosistemas acuáticos mediante el forrajeo y enterramiento en la época reproductora. Reduce la cobertura de la vegetación acuática, enriquece el agua en nutrientes, que favorecen el desarrollo de la comunidad fitoplanctónica y enturbia el agua. Su presencia en zonas marismeñas también afecta a los arrozales dañando las infraestructuras agrícolas (Gutierrez-Yurrita and Montes, 1998). Además, al ser presa de otros animales es clave para la transferencia de energía y de contaminantes entre niveles tróficos (Fleeger et al., 2003).

La introducción de *P. clarkii* en España, iniciada en los 60, está muy documentada (Habsburgo-Lorena, 1986; Gutierrez-Yurrita and Montes, 1998). Estuvo favorecida por el ambiente favorable de esos años, que permitía introducir especies americanas resistentes al parásito *Aphanomyces astaci* que había diezclado los cangrejos europeos (Anastacio and Marques, 1995). En 1974 se importó un lote de *P. clarkii*, desde Luisiana (USA) a los arrozales de la Marisma Alta del Guadalquivir y Bajo Guadalquivir (Habsburgo-Lorena, 1986). Además de la colonización natural de cauces y canales cercanos, los pescadores lo distribuyeron por la marisma del Guadalquivir incluyendo el Parque Nacional de Doñana, consiguiendo zonas de almacenamiento en época invernal cuando los arrozales están secos. En 1976, se explotaba su producción en los arrozales y sus canales y se pescaron los primeros ejemplares en el Arroyo de la Rocina y el Caño de las Nuevas dentro del PND. En 1977 la Rocina ya era un lugar de pesca y en 1979 se había extendido por todo el Bajo Guadalquivir y embalses de Sevilla, Huelva y Cádiz. En 1984, se registran los primeros ejemplares en el Lucio del Bolín y hoy está ampliamente distribuido en el PND, a pesar de los métodos de erradicación infructuosos por su gran productividad y adaptación a los sistemas fluctuantes de la marisma y los arrozales (Gutierrez-Yurrita and Montes, 1998). A pesar de los problemas ecológicos que suele provocar la introducción de una especie no autóctona, *P. clarkii* ocupa una función clave

en las redes tróficas de Doñana, como alimento de especies protegidas y es un *importante* recurso económico.

El uso de *P. clarkii* como bioindicador en el seguimiento y valoración de la contaminación del PND, permitirá 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.

III. BIOMARCADORES

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 (Tabla 2). Es decir, la biomonitorización es una solución más económica e integral que informa de la presencia y efecto de diversos factores ambientales (contaminantes) (Livingstone et al., 1989).

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). 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 (Lopez-Barea, 1995). 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 (Rueda et al., 2002).

Los biomarcadores son parámetros cuya alteración indica la exposición de los bioindicadores a contaminantes, sus efectos biológicos o los riesgos para los ecosistemas. Los biomarcadores funcionan a distintos niveles: molecular, celular, histológico, organismo, población, de comunidad o ecosistema (Tabla 2). 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 (Livingstone, 1993; Peakall, 1994; Lopez-Barea, 1995; Timbrell, 2001).

Tabla 2. *Biomarcadores, tiempo y tipo de respuesta, nivel de organización biológica al que pertenecen, y sus niveles de detección.*

Biomarcador	Respuesta biológica	Nivel de organización	Ocurrencia¹	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 de 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.

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 (Grandjean et al., 1994). La mayoría de los biomarcadores son inespecíficos, como las monooxigenasas que se inducen por muchos compuestos (Okey, 1990), aunque la δ -aminolevulinato deshidratasa se inhibe por Pb (Lopez-Barea, 1995) y algunas esterasas por OPs y CMs (Escartín and Porte, 1996). 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 (Livingstone, 1993).

Por su significado los biomarcadores se clasifican en tres tipos (Livingstone, 1993; Walker et al., 1997; Timbrell, 2001):: i) **de exposición** que indican la presencia de contaminantes, metabolitos derivados de su biotransformación o productos de su reacción con biomoléculas; ii) **de efecto** que muestran cambios bioquímicos tras la exposición, y iii) **de predicción de riesgos** que predicen la posibilidad de una alteración grave a nivel de población, comunidad o ecosistema. La estacionalidad de los procesos fisiológicos (reproducción, desarrollo, etc.) y factores ambientales (nutrientes, temperatura, etc.) condiciona sus respuestas (Sheehan and Power, 1999). 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.

La biomonitorización debe incluir las siguientes etapas: i) Definir el área de estudio y los sitios control. ii) Seleccionar los sitios de muestreo. iii) Caracterizar los sitios control y problema. iv) Escoger la especie bioindicadora. v) Elegir los biomarcadores. vi) Diseñar el muestreo. vii) Análisis químicos y biológicos. viii) Análisis estadístico e interpretación de los resultados. 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.

III.1 BIOTRANSFORMACIÓN DE XENOBIÓTICOS

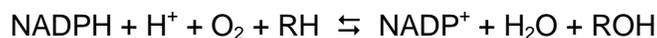
Los xenobióticos lipofílicos, como PCBs y PAHs, son fácilmente absorbidos pero difícilmente excretables. Los sistemas enzimáticos convierten los contaminantes lipofílicos en otros más polares y fácilmente excretables, lo que se denomina **biotransformación**. La biotransformación depende de la edad, dieta, estrés a que esté sometido el organismo,

especificidad de tejido u órgano, dosis del compuesto o grado de inducción o inhibición de las enzimas responsables (Timbrell, 2001). Comprende diversas reacciones. Las de **fase I** introducen en el xenobiótico grupos polares por oxidación, reducción, hidrólisis o hidratación, resultando un metabolito más hidrofílico. En la **fase II**, el grupo polar del metabolito es conjugado con moléculas endógenas, también muy polares, como glutatión, aminoácidos, ácido glucurónico, grupos sulfato, metilo o acetilo.

Las enzimas biotransformadoras de xenobióticos forman parte de las rutas metabólicas de los organismos y no son específicas para los sustratos sobre los que actúan ni para la función de detoxificación. Por ello, en ocasiones se generan metabolitos más electrofílicos/ tóxicos que los de partida, este fenómeno se conoce como **activación metabólica** (Buhler and Williams, 1988; López-Barea and Pueyo, 1998).

III.1.1. Citocromos P450 y otras enzimas de fase I

Muchas reacciones de fase I son de monooxigenación. En ellas, un átomo de O del O₂ es transferido al sustrato y el otro reducido a H₂O. Muchas monooxigenasas son sistemas acoplados de transporte de electrones con 2 enzimas (citocromo y flavoproteína oxidorreductasa) (Okey, 1990). 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 (Timbrell, 2001). Son hemoproteínas cuyo grupo prostético es una Fe-protoporfirina IX (hemo) y una cadena de entre 45 y 60 kDa (Goksoyr, 1995). 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 (Okey, 1990; Goksoyr, 1995).

Las distintas isoenzimas P450 actúan sobre muchos sustratos endógenos (esteroides, hormonas esteroideas, vitaminas liposolubles, prostaglandinas, ác. grasos, etc.) y exógenos (3-metilcolantreno, fenobarbital, PAHs, PCBs) (Timbrell, 2001). 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 (Okey, 1990). Las

actividades 7-etoxirresorufina-O-desetilasa (EROD) y benzo(a) pireno hidroxilasa (BPH) del CYP1A1 son usadas como biomarcadores (Grøsvik et al., 1997; Whitlock, 1999).

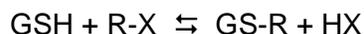
En crustáceos, se han medido los P450 en glándula antenal y estómago, pero el sitio principal de monooxigenación dependiente de P450 es la glándula digestiva, aunque la presencia de inhibidores ha dificultado su estudio en muchos decapodos (Livingstone, et al., 1989; James and Boyle, 1998). El contenido del P450 en hepatopáncreas de cangrejo es comparable al de hígado de rata, siendo CYP2 y CYP3 los más abundantes. De hecho, eritromicina, testosterona y aminopirina son monooxigenados más rápidamente que la etoxirresorufina (Lindstrom-Seppa and Hanninen, 1986; Aragon et al., 2002). La inducción de los CYP1 en crustáceos es muy discutida, algunos estudios indican que los PAHs, pero no inductores tipo phenobarbital, podrían inducir CYP1 (James and Boyle, 1998). Aunque existen estudios de toxicidad en crustáceos y la inducción de cP4501A por 3-metilcolantreno y fenitrotion en cangrejos ha sido demostrada, se conoce poco sobre sus la función y regulación de los P450 (Escartín and Porte, 1996; Ishizuka et al., 1996).

Las **flavín monooxigenasas** también son enzimas de fase I. Catalizan la oxidación de compuestos nitrogenados y sulfurados (Timbrell, 2001). En crustaceos, participan en la biotransformación de muchos xenobióticos (Ziegler, 1988; Schlenk, 1995).

El sistema del **citocromo b₅** (citocromo b₅ y NADH-cit b₅ reductasa) y las **epóxido hidrolasas** son otras importantes enzimas de fase I. Activan a las monooxigenasa del citocromo P450 y catalizan la conversión de epóxidos (productos de los P450) en dihidrodioles menos reactivos (Timbrell, 2001).

III.1.2. Enzimas de fase II

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



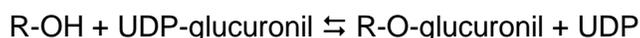
R es un radical alifático, aromático o heterocíclico, y X halógeno, sulfato, nitrito o epóxido.

Se clasifican en 2 superfamilias con diferente estructura, actividad, distribución celular y actividad biológica: GST microsomales, unidas al retículo endoplásmico, y GST citosólicas, agrupadas en 13 familias: α, β, δ, ζ, λ, τ, μ, π, φ, σ, θ, ω y DHAR (Frova, 2006). Las citosólicas son homo- o heterodiméricas de ~28 kDa cada subunidad (Ouassiss et al., 2002). Actúan sobre tóxicos derivados del daño oxidativo a lípidos y ácidos nucleicos, e intermediarios en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos (Ketterer, 2001; Sheehan

et al., 2001). Además, participan en la biotransformación de fármacos, carcinógenos y plaguicidas (Ranganathan et al., 1993).

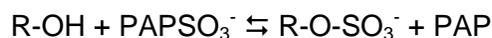
En crustáceos, GST es inducible por cipermetrin, aceites, lindano y permetrin en hepatopáncrea. La inducción de la GST por contaminantes orgánicos permite su uso como biomarcador de contaminación en glándula digestiva de crustaceos (Ishizuka et al., 1998; McLoughlin et al., 2000 ; Gowland et al., 2002 ; Arun et al., 2006).

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 (Timbrell, 2001).

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



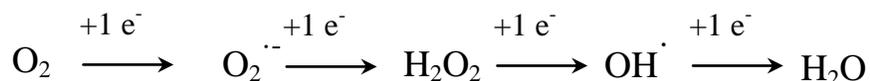
Ocasionalmente, esta conjugación aumenta la toxicidad de los sustratos (Timbrell, 2001).

Las **N-acetiltransferasas** conjugan xenobióticos con grupos amino a grupos acetilos provenientes de la acetil-CoA (Timbrell, 2001), según la reacción:



III.2 ESTRÉS 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 (Kruk, 1998). En ocasiones las defensas celulares frente a las EROs no son lo suficiente eficaces y se produce **estrés oxidativo** (Winston and Di giulio, 1991). Las EROs se forman por reacciones endógenas o inducidas por bifenilos, aminas aromáticas y metales, durante la reducción unielectrónica del O₂ (Sies, 1986; López-Barea and Pueyo, 1998):



Muchas reacciones producen **radical anión superóxido** (O₂^{·-}): *i*) oxidación de moléculas endógenas (semiquinonas, flavinas, tioles, catecolaminas) y metales, *ii*) actividad de oxidasas y deshidrogenasas (NADPH-P450 reductasa, NADH oxidasa,

xantina oxidasa) y cadenas de transporte electrónico, *iii*) metabolismo de algunos xenobióticos, quinonas nitroaromáticas, bifenilos (ej. paraquat) y metales de transición, *iv*) ciclado redox (Sies, 1986; Winston and Di giulio, 1991; Kruk, 1998).

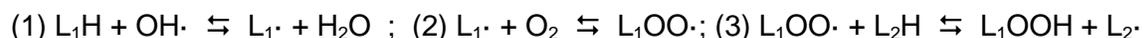
El **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2) se forma por dismutación espontánea o enzimática (superóxido dismutasa) del $\text{O}_2^{\cdot -}$, o por reducción dielectrónica directa del O_2 , catalizada por la ácido graso oxidasa, aminoácido oxidasa, etc. (Kruk, 1998).

La especie más reactiva es el **radical hidroxilo** ($\text{OH}\cdot$), formado a partir de $\text{O}_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 en la reacción de Fenton (Kruk, 1998) catalizada por iones metálicos:



III.2.1. Daños oxidativos

Las EROs causan **daños oxidativos** en las biomoléculas (Winston and Di giulio, 1991; Kruk, 1998). 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 (Rodríguez-Ariza et al., 1999). La formación de disulfuros mixtos entre proteínas y GSH altera el estado redox intracelular entre las formas reducida y oxidada del glutatión. Las EROs provocan numerosos daños en el DNA, rotura de cadenas, alteración de bases, aberraciones cromosómicas e intercambios entre cromátidas hermanas, que pueden provocar mutaciones (Sies, 1986; López-Barea and Pueyo, 1998). La formación de 8-oxodG, mediado por $\text{OH}\cdot$, es usada como biomarcador de contaminación y estrés oxidativo (Alhama et al., 1998; Rodríguez-Ariza et al., 1999). El radical hidroxilo también ataca los ácidos grasos poliinsaturados, integrantes de los fosfolípidos de las membranas, en una reacción llamada **peroxidación lipídica** (Winston and Di giulio, 1991; Brown and Kelly, 1996):



Si los lipohidroperóxidos formados (LOOH) no se eliminan generan (reacciones catalizadas por metales) otros radicales ($\text{LO}\cdot$) que pueden atacar otras biomoléculas, ácidos nucleicos y proteínas (Winston and Di giulio, 1991).

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 (Gutteridge and Halliwell, 1990; Brown and Kelly, 1996).

III.2.2. Defensas celulares contra el estrés oxidativo

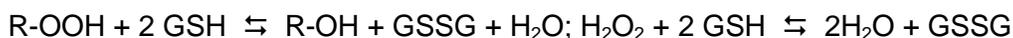
Los sistemas antioxidativos eliminan EROs para evitar daños en los organismos (Sies, 1986; Winston and Di giulio, 1991; Kruk, 1998). Puesto que muchos contaminantes ambientales incrementan la producción de EROs, estos sistemas tienen gran importancia en la defensa de los organismos contra la contaminación ambiental.

El sistema de defensa antioxidativo incluye: i) enzimas (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) que destoxifican directamente las EROs; ii) defensas no enzimáticas (vitaminas C y E) capaces de destoxificar EROs interrumpiendo la cadena de reacciones que las generan; y iii) sistemas auxiliares (glucosa-6-P deshidrogenasa, glutatión reductasa) que regeneran poder reductor, NADPH y GSH, que se consume durante destoxificación de las EROs (Kruk, 1998).

Las **superóxido dismutasas** catalizan la dismutación del radical anión superóxido, en la reacción: $2 O_2^{\cdot -} + 2 H^+ \rightleftharpoons H_2O_2 + O_2$. En eucariotas, se distinguen las isoenzimas Cu/Zn-SOD, citosólicas e inhibibles por cianuro, y Mn-SOD, de la matriz mitocondrial y no inhibible por cianuro (Pedrajas et al., 1998). La SOD es inducible por contaminantes y alto nivel de O_2 (Lopez-Barea, 1995).

La **catalasa** es una hemoproteína localizada principalmente en los peroxisomas (Kruk, 1998). Dismuta el H_2O_2 , según la reacción: $2 H_2O_2 \rightleftharpoons 2 H_2O + O_2$

La **glutatión peroxidasa** es una enzima citosólica dependiente de Se que cataliza la reducción de peróxidos orgánicos y H_2O_2 , usando GSH como donador de electrones:



Algunas GSTs poseen actividad glutatión peroxidasa independiente de Se, catalizando la reducción de lipohidroperóxidos libres (Mosialou and Morgenstern, 1989).

La **vitamina E** (α -tocoferol) combate la peroxidación lipídica en las membranas celulares al reaccionar con los radicales lipídicos y romper la cadena de peroxidación lipídica. La **vitamina C** reduce la semiquinona del α -tocoferol (Kruk, 1998).

La **glutatión sintetasa** y **glutatión reductasa** son responsables de la síntesis y reducción del glutatión (Lopez-Barea, 1995). La **glucosa-6-P deshidrogenasa** y la **6-fosfogluconato deshidrogenasa**, forman parte de la ruta de las pentosas fosfato y producen NADPH (Sies, 1986). La **NADPH-quinona oxidorreductasa** cataliza la reducción divalente de quinonas a hidroquinonas, evitando así la producción masiva de anión superóxido y el consumo excesivo de NADPH (Solé et al., 1995).

III.3 ESTERASAS

Las esterasas, ubicuas en animales y vegetales, son >60 enzimas que hidrolizan ésteres de ácidos orgánicos o inorgánicos. Aunque su clasificación ha sido muy discutida, por su reactividad frente a los OPs se dividen en tres tipos (Reiner et al., 1993). Dos de ellas interaccionan con OPs: (i) **esterasas B**, hidrolizan ésteres con radicales alquílicos y se fosforilan/inhiben por OPs y (ii) **esterasas A**, hidrolizan sobre todo ésteres con grupos arílicos e inactivan/hidrolizan OPs. Un tercer tipo, (iii) **esterasas C**, prefieren ésteres de acetato y no interaccionan con plaguicidas (Aldridge, 1993; Walker et al., 1997).

Las esterasas A destoxifican plaguicidas. Especies e individuos con diferentes niveles de esterasas A difieren en su tolerancia a plaguicidas. Se dividen en: arildialquilfosfatasa (EC 3.1.8.1) y diisopropilfluorofostasa (EC 3.1.8.2), aunque su mecanismo de hidrólisis, sustratos “naturales” y clasificación no están bien establecidos (Walker, 1989).

Las esterasas B forman la superfamilia Ser-esterasas, incluyendo las colinesterasas (ChEs), acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) y butirilcolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8), y las carboxilesterasas (CbE, EC 3.1.99.1 a 3.1.99.x). Las esterasas B son inhibidas por OPs, y son los blancos preferentes para la toxicidad de plaguicidas (Galgani and Bocquene, 1990; Sanz and M., 1995; Sanchez et al., 1997).

III.3.1 Colinesterasas

Las ChEs se distinguen por su especificidad de sustrato. La acetilcolina (ACh) es el sustrato fisiológico de la AChE, y la butirilcolina (BuCh) es el indicado para BChE. Los ésteres colina y tiocolina son buenos sustratos de la AChE, con el orden siguiente: ATCh > PTCh > BTCh, y también de BuChE, con el orden: PTCh > BTCh > ATCh. Su selectividad se debe a diferencias en su bolsillo acilo, que en la BuChE permite la unión de sustratos e inhibidores mayores como el *isoOMPA* (tetrakisopropil-pirofosforo-amida). La hidrólisis de sustrato por ambas ChEs se desvía de la cinética de Michaelis-Menten. Generalmente, la AChE la sigue a concentraciones de ACh < 1 mM, y se desvía a altas concentraciones, inhibida por exceso de sustrato, mientras que la BuChE aumenta, activada por exceso del sustrato.

Las ChEs también difieren en su localización y función. La AChE está sobre todo en el sistema nervioso central, las uniones neuromusculares, y el sistema hematopoyético de vertebrados y desempeña un papel crítico en la neurotransmisión, hidrolizando la ACh, en las sinapsis nerviosas (Fig. 7).

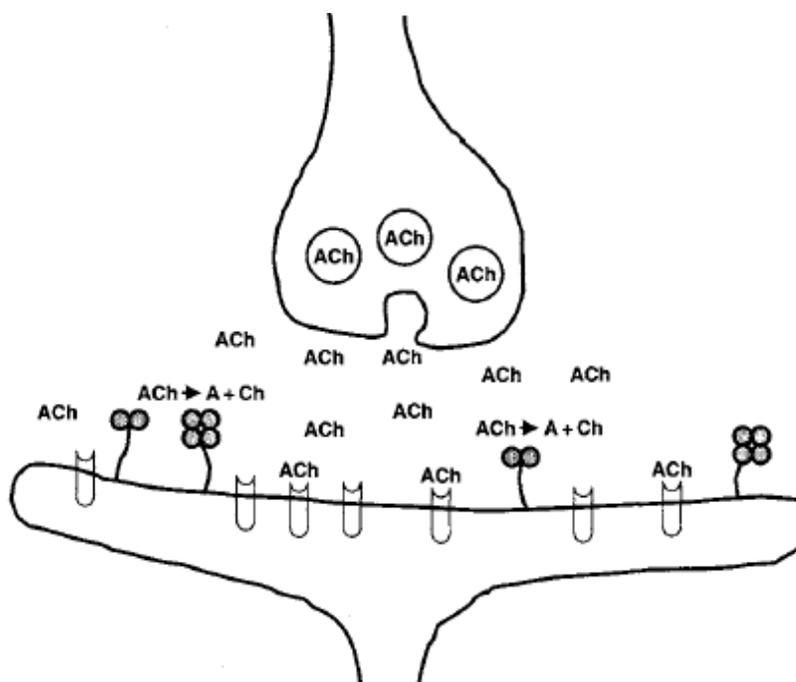


Fig. 7. Papel de AChE en el nervio colinérgico. Los círculos sombreados muestran subunidades de la AChE. La acetilcolina (ACh) almacenada en la presinapsis se libera al despolarizarse el nervio, difunde por la sinapsis y activa los receptores colinérgicos de la membrana postsináptica. La acción de la ACh acaba con su hidrólisis por la AChE. La inhibición de la AChE por OPs o CMs acumula ACh en el espacio sináptico y mantiene la transmisión colinérgica.

La BChE se localiza en hígado, suero y riñón. Aunque se une y neutraliza los plaguicidas, su papel fisiológico no está claro. Estudios histoquímicos en cerebro y corazón muestran que ciertas neuronas tienen BuChE y no AChE (Darvesh and Hopkins, 2003) y se han sugerido numerosos papeles de la BuChE, metabolismo de lipoproteínas (Kutty and Payne, 1994), adherencia celular (Tsigelny et al., 2000), y etiología de enfermedades neurodegenerativas (Darvesh and Hopkins, 2003). Además, la BuChE metaboliza fármacos miorelajantes (suxametonio, mivacurio) y drogas de abuso (cocaína, heroína). Su deficiencia puede conducir a apnea y parálisis tras su administración.

Las ChEs son glucoproteínas en su mayoría unidas a membrana, por lo que su solubilización requiere el uso de detergentes no iónicos, como el Tritón X-100, o heparina. Sin embargo, su uso en la preparaciones de extractos de ensayo de actividades esterasas totales (soluble y unida a membrana) como biomarcadores de contaminación es cuestionable, pues trabajos en cerebro de rata y *P. clarkii* muestran la interacción de detergentes con esterasas (Rosenfeld et al., 2001; Vioque-Fernandez et al., 2007b).

III.3.2. Carboxilesterasas

Son esterasas dependiente de Ser que hidrolizan y biotransforman plaguicidas, fármacos y drogas, como inhibidores de la angiotensina (temocapril, cilazapril, quinapril, imidapril) (Furihata et al., 2004), fármacos antitumor (CPT-11, capecitabina) (Tabata et al., 2004), narcóticos (cocaína, heroína, y meperidina) (Bosron et al., 1997; Zhang et al., 1999), ésteres endógenos de ácidos grasos, acilgliceroles, acilcarnitina de cadena larga, y ésteres del acil-CoA de cadena larga. Son ubicuas, sobre todo en hígado, con pequeños niveles en intestino, riñón, y pulmón (Sato et al., 2002). La CbE juega un papel importante en la detoxificación y tolerancia a algunos plaguicidas (Fig.8) (Walker et al., 2001).

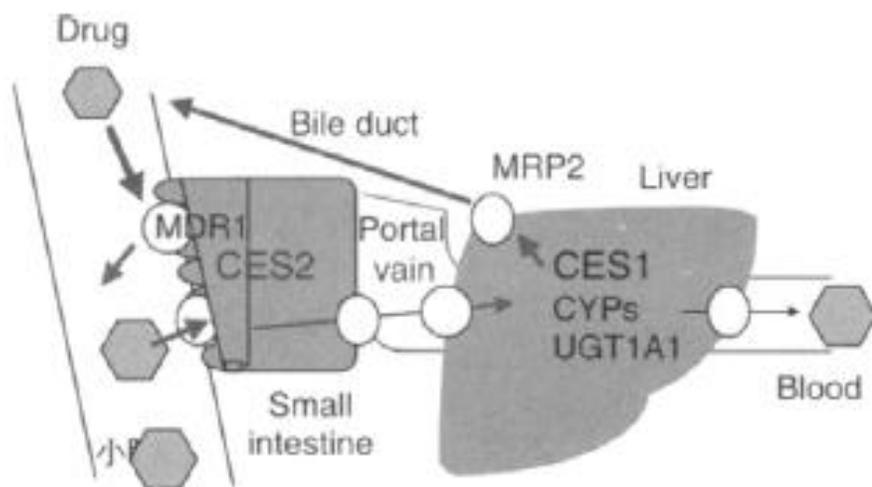


Fig. 8. *Papel de la CbE en el metabolismo de drogas.* CES, carboxilesterasa; CYP, P450; UGT, UDP glucuronosiltransferasa; MDR, resistencia a multidroga; MRP2, resistencia a multidroga asociado a proteína 2, (Walker et al., 2001).

Clasificar las CbEs por su especificidad de sustrato es difícil al tener actividad hidrolasa, lipasa, o ambas (Mentleinet al., 1984). Por su homología y características bioquímicas (especificidad de sustrato, distribución tisular, y regulación transcriptional) se clasifican en cuatro familias; CbEs1, CbEs2, CbEs3, y CbEs4 (Sato et al., 2002). Algunas están implicadas en la activación de ciertos carcinógenos, y están asociadas al hepatocarcinogenesis (Maki et al., 1991).

Aunque se asume que la butirilticolina (BTCh) es hidrolizada sólo por BChE, y la adición de BTCh detiene la hidrólisis de acetilticolina (ATCh), medir las distintas esterasas requiere usar diferentes sustratos (Tabla 3) o inhibidores, para diferenciarlas en una muestra con mezcla de ellas. Etopropazina, bambuterol, quinidina, e iso-OMPA

inhiben la BuChE, mientras huperzina A y BW2845 inhiben la AChE y la eserina es específica de la CbE (Harel et al., 1992; Vellom et al., 1993; Cygler et al., 1993 ; Kovarik et al., 2003).

Tabla 3. *Sustratos usados en la medida de actividad esterasa.*

SUSTRATO	NOMBRE
$H_3C-C(O)-OCH_2CH_2 N^+ (CH_3)_3 X^{-a}$	Acetilcolina (Ach)
$H_3C-C(O)-SCH_2CH_2 N^+ (CH_3)_3 X^-$	Acetitiocolina (ATCh)
$H_5C_2-C(O)-SCH_2CH_2 N^+ (CH_3)_3 X^-$	Propioniltiocolina (PTCh)
$H_7C_3-C-C(O)-SCH_2CH_2N^+ (CH_3)_3 X^-$	Butiriltiocolina (BTCh)
$H_5C_6-C(O)-OCH_2CH_2 N^+ (CH_3)_3 X^-$	Benzoilcolina (BzCh)
$\begin{matrix} \text{CH}_2-\text{C}(O)-OCH_2CH_2N^+ (CH_3)_3 \\ \text{CH}_2-\text{C}(O)-OCH_2CH_2N^+(CH_3)_3 2X^- \end{matrix}$	Succinildicolina (SuxCh)
$\begin{matrix} \text{CH}_2-\text{C}(O)-SCH_2 CH_2 N^+ (CH_3)_3 \\ \text{CH}_2-\text{C}(O)-SCH_2 CH_2N^+(CH_3)_3 \end{matrix}$	Succinilditiocolina (SuxTCh)

^aX⁻ es un anion.

III.3.3. Reacción enzimática e inhibición por Ops y Cms

El O de la Ser del s. activo ataca nucleofílicamente el C electrofílico del carbonilo de la ACh, originando enzima acetilada y liberando colina (Quinn, 1987). La deacilacion ocurre cuando el agua (ion HO⁻) ataca nucleofílicamente la enzima acetilada, liberando acetato (Fig. 9). La inhibición por OPs y/o Cms de Ser-hidrolasas es análoga a esta hidrólisis, y está mediada por fosforilacion o carbamilación de la Ser del sitio activo. El bolsillo del s. activo de la enzima orienta el plaguicida para que interaccione con la Ser, análogo a la formación de un complejo de Michaelis-Menten. En este poceso se polariza el enlace P=O (C=O en los Cms) promoviendo un ataque al O de la Ser (Fig. 10) (Aldridge and Reiner, 1972). La Ser se fosforila (OPs) o carbamila (Cms), y el resto de la molécula se disocia. Mientras el intermedio acetilado es muy labil y se rompe rápidamente, la enzima carbamilada requiere que una molécula de agua ataque el carbón del C=O para reactivarla y producir un derivado ácido carbamico. En cambio, el intermedio fosforilado es muy estable y requiere el ataque de un reactivo nucleofílico enérgico, como las oximas, pare su reactivación. Es decir, la regeneración de la forma activa de la enzima es muy rápida en la forma acetilada (catálisis normal), más lenta en la enzima carbamilada, y extraordinariamente lenta en la enzima fosforilada.

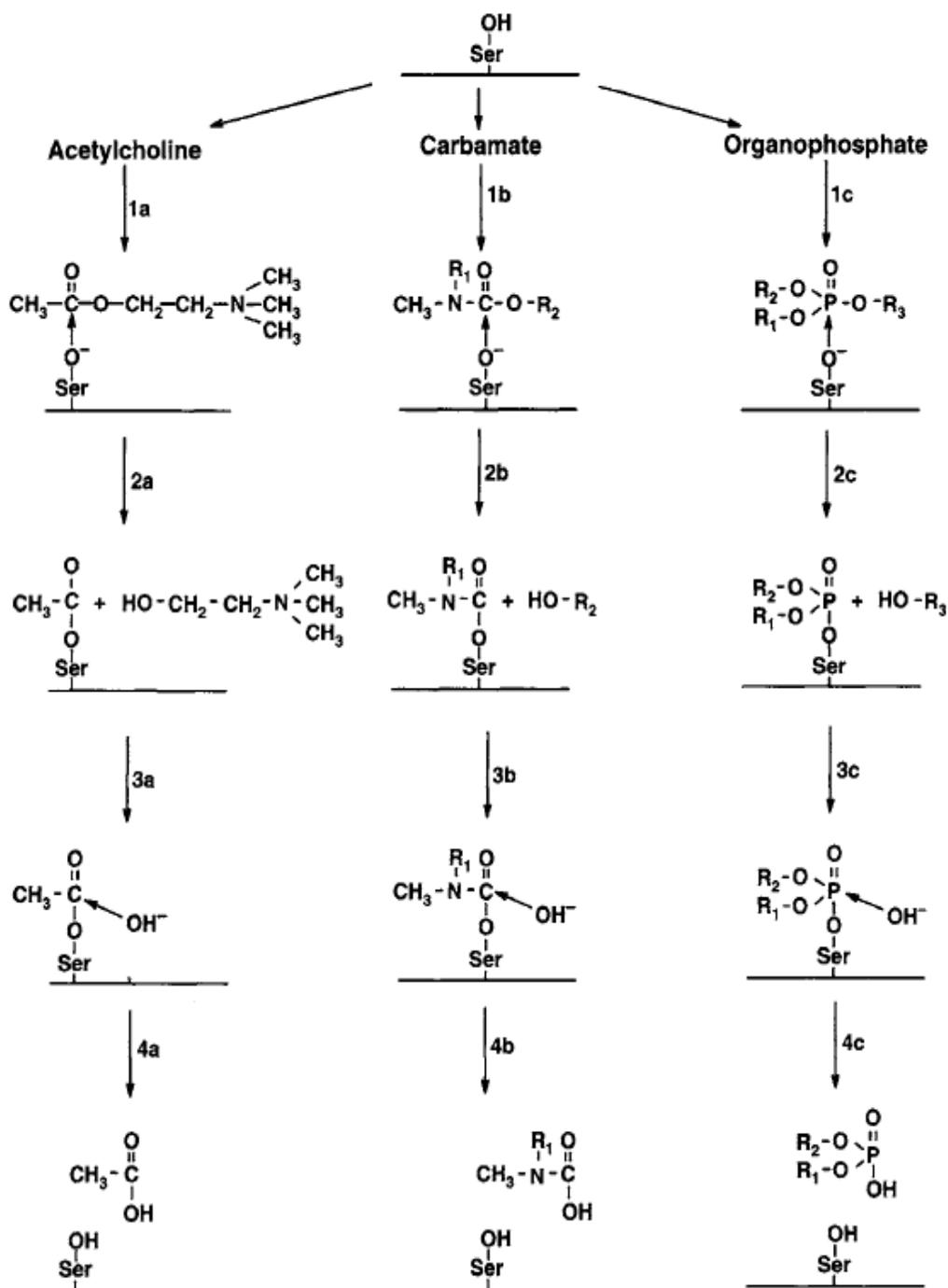


Fig. 9. *Interacción de ACh, CMs, y OPs con la Ser del s. activo de Ser-hidrolasas.* Reacción 1: formación del complejo de Michaelis y ataque nucleófilo de la Ser del sitio activo. Reacción 2: acilación de la Ser y liberación del primer producto de reacción. Reacción 3: ataque nucleofílico del ion hidroxilo, que permite la regeneración de la enzima activa (reacción 4).

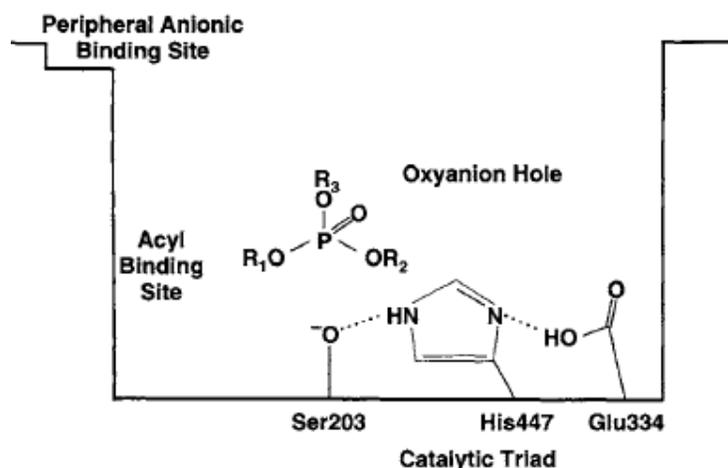
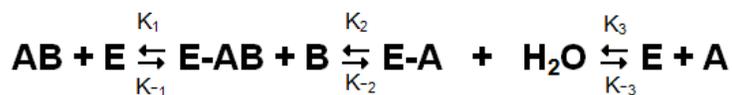


Fig. 10. *Entrada del OP al s.activo de la AChE.* Triada catalítica (Ser, His y Glu) y grupo saliente (R3). El sitio de unión acilo posiciona el inhibidor para el ataque nucleofílico de la Ser, mientras se polariza el enlace P=O y se facilita el ataque nucleofílico. El sitio aniónico periférico es importante en la estereoselectividad de la AChE (Ordentlich et al., 1996).

La interacción de CMs y OPs con las esterasas sigue una cinética “Ping Pong Bi Bi” (Fig. 11) reducido a “Ping Pong Uni Bi” (si hay agua en exceso) (Segel, 1975). La unión reversible inhibidor-enzima (K_D) y la fosforilación o carbamilación (K_2) determinan la reactividad del inhibidor, específica de especie, estructura del sitio activo y plaguicida.



$$K_D = k_{-1}/k_1 \quad K_i = k_2/k_D$$

Fig. 11. *Interacción de plaguicidas y esterasas.* AB, plaguicida; E, enzima libre; EAB, complejo de Michaelis; E-A, intermediario carbamilo ó fosforilado; B, primer producto liberado; k_1 y k_{-1} constante de formación y disociación del c. de Michaelis; k_2 , constante de acilación de la Ser del sitio activo y k_{-2} (constante del paso inverso); k_3 , constante de reactivación de la enzima por agua y k_{-3} (constante inversa de la reactivación de la enzima por agua). k_{-2} y k_{-3} son insignificante en la inhibición por CMs y OPs.

La exposición prolongada o repetida a un plaguicida suele disminuir el grado de inhibición de esterasas, quizás al desarrollarse tolerancia (Johnson Rowsey and Gordon, 1997). Ésta puede adquirirse de varias maneras: i) cambio del número de receptores; ii) disminución de afinidad del receptor; iii) mayor biotransformación por enzimas como paraoxonasas (PONs) y somanasas; iv) presencia de otras proteínas (CbEs, BChEs, o albúmina) que puedan unirse al plaguicida haciendolo menos disponible o inactivo.

III.3.4. Actividad esterasa. Método Ellman

Para medir las actividades esterasas hay numerosos métodos (Naik et al., 2008):

i) Disminución del sustrato, usando [¹⁴C] o [³H] ACh (Jensen-Holm et al., 1959).
 ii) Aumento en la concentración de H⁺, asociada a la hidrólisis del éster, por titulación con una base.

iii) Liberación de colina, tras su oxidación y reacción del H₂O₂ con peroxidasa-fenol-4-aminoantipirina para dar un cromoforo medido en 500 nm (Abernethy et al., 1988).

iv) Liberación de tiocolina ó **método Ellman** (Ellman et al., 1961), tras su reacción con 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) para formar 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB). Por su alta sensibilidad, reproductibilidad y simplicidad, es el más usado para medir actividad esterasa. La actividad se mide a 412 nm durante varios minutos. El coeficiente de extinción del TNB es 13600 M⁻¹ cm⁻¹ en 0.01 M de tampón fosfato (pH 8.0).

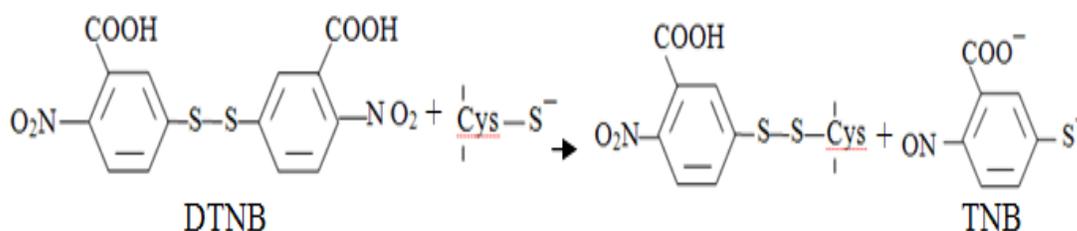


Fig.12. Reacción de Ellman.

El DTNB reacciona también con otros compuestos tiolicos. Si las muestras contienen dichos compuestos, primero debe añadirse el DTNB y cuando su reacción con otros tioles haya terminado se añade el sustrato. Por ello, el tampón de reacción no debe tener DTT ni someter la muestra a procesos que modifiquen su contenido SH. Hay kits para medir rutinarias de las actividades esterasas basados en el método Ellman (Borhan et al., 1995).

III.3.5. Reactivación y envejecimiento

Compuestos fuertemente nucleofílicos, como la N-metilhidroxilamina, aceleran la reactivación de las Ser-hidrolasas fosforiladas (Wilson and Ginsburg, 1955). En base a la estructura de ACh, AChE y los OPs, se han sintetizado agentes reactivadores de esterasas inhibidas por OPs, como hidroxilamina, ácido hidroxámico y oximas. Atacan nucleofílicamente el P de la enzima fosforilada y liberan su forma fosforilada y la enzima activa. La **pralidoxima** (2-PAM, 1-metilpiridina-6-carbaldehído), 10⁶ veces más potente que la hidroxilamina para reactivar la AChE, es el más usado, mientras **obidoxima** [bis (4-

hidroxiamino-diclorometil-metilpiridinio) éter], **HI-6** [ClH dimetil éter-1(piridinio 2-hidroxiiminometil-1)-l-(4-carboxiami-nopiridinio)], **TMB4** [1.1'- trimetileno bis (4 (hidroxiimino) dibromuro de piridinio)], y **LtiH6** [1.1'- (oxibismetileno) bis 4-(hidroxiiminometil) dicloruro] son menos usadas (Rousseaux and Dua, 1989; Kwong, 2002). La reactivación depende de las estructuras del fosfilo y la oxima, y la naturaleza de la enzima. Ciertas oximas fosforiladas reinhibien la enzima reactivada, aunque esto se previene con compuestos (edrofonio) que compiten con la oxima por el sitio activo de la AChE (Luo et al., 1999).

La reactivación debe preceder al **envejecimiento** (dealquilación del fosfilo, una vez fosforilada la Ser), pues el ester Ser-monofosfato resiste a la reactivación (Fig. 13). El envejecimiento tiene gran significado toxicológico (Aldridge and Reiner, 1972; Shafferman et al., 1996; Worek et al., 1996), pues la actividad esterasa envejecida solo se recupera sintetizando nuevas moléculas de enzima (Masson et al., 2000). El envejecimiento depende de las estructuras del OP y la enzima. La vida media va de 31 horas en la AChE dietilfosforilada, a ~1 min en algunos agentes nerviosos (Talbot et al., 1988; Worek et al., 1999). La BChE fosforilada envejece algo más rápido que la AChE (Masson et al., 1997).

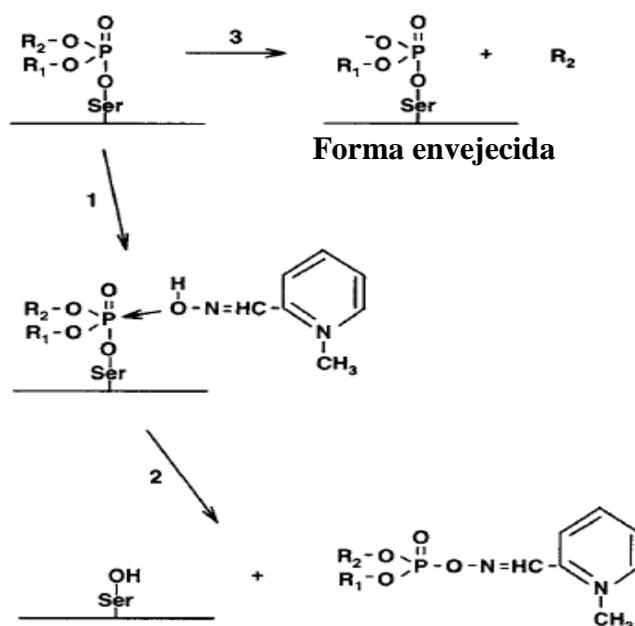


Fig. 13. Reactivación y envejecimiento de las Ser-hidrolasas fosforiladas. 1: Ataque nucleofílico de la pralidoxima al P. 2: Regeneración de enzima libre y liberación de oxima fosforilada. 3: Envejecimiento y formación del ester monofosfato resistente a la reactivación por oximas.

La enzima envejecida puede resistir a la reactivación por: i) Mayor estabilidad, al formarse un puente salino entre la His protonada del s. activo y el O con carga negativa del monofosfilato; ii) Repulsión electrostática entre las oximas y las cargas negativas del monofosfilato y un aminoácido adyacente (Masson et al., 2000).

Las oximas, en particular el 2-PAM, se usan en estudios de exposición a OPs para evaluar el grado de envejecimiento de las esterasas (Worek et al., 1996). Muchos estudios sólo comparan la actividad esterasa de zonas contaminadas y referencia (animales con menor actividad los más expuestos a plaguicidas) y no determinan qué tipo de plaguicida (OPs/CMs) ha causado su inhibición (Fuortes et al., 1993; Casida and Quistad, 2005). Esto dificulta cuantificar su efecto y la fuente de contaminación.

Este trabajo pretende determinar qué tipo de plaguicida inhibe las esterasas. Para reactivar una enzima inhibida por CMs basta diluir, retirando el exceso de plaguicida, pero una enzima expuesta a OPs requiere usar una oxima (Monserrat and Bianchini, 2000). No obstante, la reactivación por 2-PAM de la enzima depende del tiempo tras la exposición a OPs, debido al envejecimiento (Galgani and Bocquene, 1990; Sanchez Hernandez and Sanchez, 2002). La medida de actividades esterasa (AChE, BChE y CbE) en *P. clarkii* permitirán evaluar la amenaza y grado de exposición a plaguicidas, OPs y/o CMs, procedentes de la actividad agrícola desarrollada en el entorno Doñana, al que está sometido el PND.

III.3.6. Otras proteínas que interaccionan con Ops y Cms

Además de la inhibición de las B-esterasas, otros mecanismos contribuyen a la toxicidad por plaguicidas. Las diferentes respuestas a plaguicidas se explican por las enzimas implicadas en su biotransformación, que al interaccionar con plaguicidas también pueden considerarse biomarcadores de exposición (Tabla. 4).

Aunque casi todos los OPs/CMs se unen a las B-esterasas, cada plaguicida reacciona con proteínas específicas y muestra características de toxicidad propias. En humanos expuestos a OPs, 3 proteínas, AChE, BuChE y esterasa blanco de neuropatía, se unen covalentemente al plaguicida. En roedores, 8 proteínas se unen a OPs: hidrolasa del acilpeptido, CbE, arilformamidasa, receptores muscarinico M2 y nicotínicos de ACh, fosfolipasa A2, amida hidrolasa de ác. grasos y albúmina, confirmando que las proteínas que reaccionan con el plaguicida dependen del tipo de plaguicida y la especie (Pewnim and Seifert, 1993; Song et al., 1997; Pope, 1999; Kidd et al., 2001; Smulders et al., 2004).

Tabla 4. *Proteínas que interaccionan covalentemente con los OPs*

Tipo de proteína	Ejemplos
Serin esterasas	AChE, BChE, CbE, Acyl-CoA hidrolasa de cadena larga
Serin peptidasas	Acilopeptidasa, Propiloligopeptidasa, Dipeptidil peptidasa IV
Serin proteasas	Tripsina, Quimotripsina, Elastasa, Trombina, Plasminogen
Cistein proteasas	Papaina, Bromelaina
Serina amidasas	Arilformamidasa, Amida hidrolasa de acidos grasos
Receptores	Receptor muscarinico M2, receptor nicotínico, receptor CB1
Fosfolipasas	Fosfolipasa A2, NTE- lisofosfolipasa
Otras	Albumina

(Pewnim and Seifert, 1993; Song et al., 1997; Pope, 1999; Kidd et al., 2001; Smulders et al., 2004).

La unión a BChE, CbE y albúmina no se cree tóxica. Estas proteínas podrían neutralizar los OPs y se cree que protegen la AChE (Mileson et al., 1998). Además, los niveles de toxicidad dependen de las enzimas que activan los OPs, P450, y las que los inactivan, paraoxonasas, glutatión transferasas, y flavin monooxigenasas (Chambers and Levi, 1992; Chambers and Carr, 1995; Costa, 2006).

III.4. PROTEÓMICA. ANÁLISIS PROTEÓMICO

El dogma central de la Biología Molecular relaciona los genes –contienen la información- y proteínas –realizan las funciones biológicas. Sin embargo, un gen codifica varias especies proteicas (Dowsey et al., 2003) y la cantidad de una proteína en un momento dado varía. De hecho, las secuencias génicas no informan por sí solas sobre la estructura final, abundancia y función de las proteínas y la regulación de muchos procesos celulares se basa en la modificación de las proporciones de las proteínas presentes en la célula.

Cada una de los miles de proteínas expresadas puede tener varias modificaciones post-traduccionales o formar complejos con otras debido a cambios ambientales o el estado fisiológico, aumentando el número de proteínas presentes (Liebler, 2002). La Proteómica estudia el proteoma, conjunto de proteínas expresadas por un genoma en un compartimento celular, célula, tejido o organismo en un momento y una condición dada (Gygi and Aebersold, 2000; Snape et al., 2004). Su desarrollo ha sido posible por el

avance convergente de diferentes áreas, secuenciación de nuevos genomas, métodos analíticos y bioinformáticos (Dowsey et al., 2003; Patterson and Aebersold, 2003; Gorg et al., 2004) que varían con el objetivo del trabajo a realizar.

El estudio del proteoma incluye: i) Proteómica de expresión, estudio cuantitativo del nivel, distribución subcelular y modificación post-transduccional de las proteínas codificadas en cierta condición o inducidas por un estímulo. ii) Proteómica funcional, proteínas expresadas por una célula o tejido en un momento, y su secuencia, estructura, actividad y función, interacción con otras, localización en una ruta específica (Patterson and Aebersold, 2003; Wang and Hanash, 2003). Las aplicaciones de los estudios proteómicos son:

1. Proteómica de “expresión diferencial”, cuantificación de los niveles protéicos entre estados o condiciones diferentes de un organismo (Gygi and Aebersold, 1999).

2. Identificación a gran escala de proteínas caracterizando sus modificaciones post-traduccionales (fosforilación, glicosilación, etc.), clave en su mecanismo de regulación (Jensen, 2004).

3. Estudio de las interacciones proteína-proteína por técnicas de afinidad, espectrometría de masas o el sistema de doble híbrido de levaduras.

Además de identificar dianas terapéuticas en Biomedicina, una de las aplicaciones más relevantes de la Proteómica (Wittke et al., 2004), se ha desarrollado la Proteómica Ambiental que identifica las proteínas expresadas y sus cambios de expresión en ciertas condiciones ambientales (Bradley et al., 2002; Lopez-Barea and Gomez-Ariza, 2006; Sheehan, 2006). La finalidad de todo estudio proteómico es identificar y caracterizar las proteínas que intervienen en él. Para ello, el modelo general de análisis comprende: a) la separación de proteínas, b) su digestión proteolítica, c) su identificación y d) la caracterización de las proteínas.

Generalmente se usan 2 esquemas de trabajo (Fig 14): A) Separar las proteínas de la muestra y digerir solo las que queremos analizar por espectrometría de masas, e identificarlas y caracterizarlas con herramientas bioinformáticas. B) Digerir la muestra, separar sus péptidos por cromatografía líquida en tándem, conectadas “on-line” a un sistema de espectrometría de masas, que permite identificar muchas proteínas a la vez (Gorg et al., 2004).

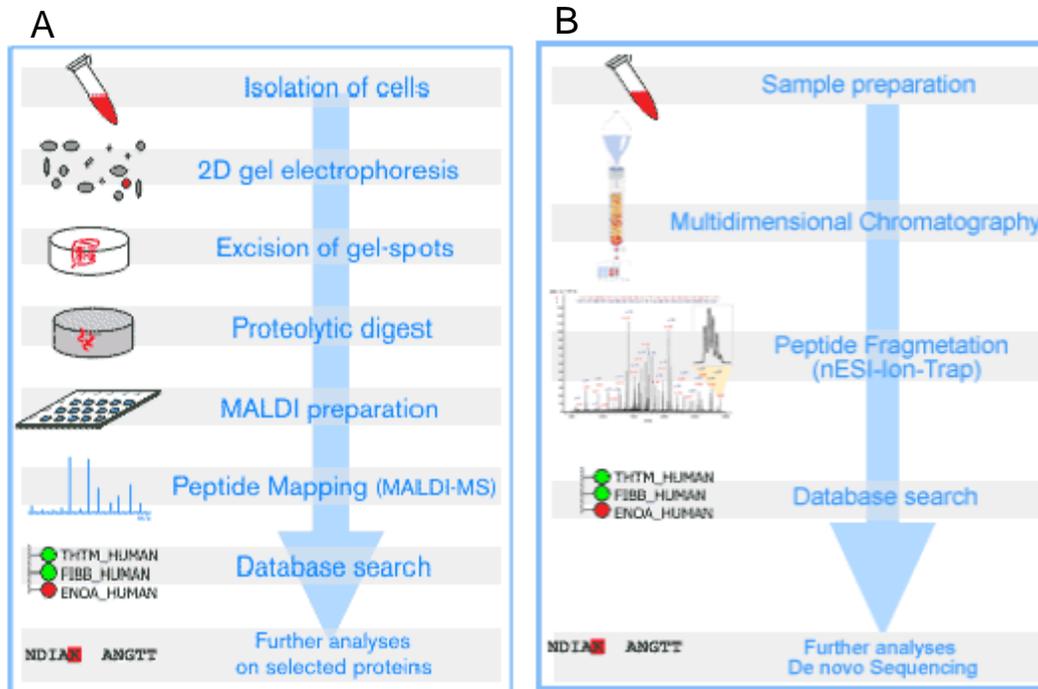


Fig. 14. *Esquemas de trabajo proteómico.* A) El más clásico y usado, basado en la 2-DE. B) El enfoque más actual y de mayores expectativas se basa en la cromatografía multidimensional.

La muestra contiene muchas proteínas, que deben separarse, y otras moléculas, que pueden interferir. Antes de la separación, se trata con diversos compuestos (inhibidores de proteasas, benzonasa, etc.). Las técnicas de separación más usadas son:

1. Electroforesis bidimensional (2-DE), que separa en función del punto isoeléctrico (1ª dimensión) y masa (2ª dimensión) de cada proteína. Se obtiene un gel bidimensional, una especie de matriz donde cada mancha, representa una proteína.

2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que separa por su polaridad (f. normal o reversa), interacción electrostática (int. iónico), tamaño (exclusión molecular), o afinidad por ligandos de la fase estacionaria (metales, fosfato, glutatión, etc.).

Las técnicas en fase líquida, HPLC y electroforesis capilar, acopladas a diferentes sistemas de espectrometría de masas (MS) son las más usadas (Wang and Hanash, 2003). A pesar de su potencial analítico, su coste supera a la 2-DE (Gorg et al., 2004).

El análisis de proteínas por MS requiere su digestión en péptidos bien definidos con proteasas específicas (Tabla. 5). Las endoproteasas cortan internamente la proteína, dando péptidos relativamente largos, y las exoproteasas atacan los extremos generando

péptidos pequeños o aminoácidos. Varios programas de simulación predicen el número y tipo de péptidos tras la digestión, como el PeptideCutter (www.expasy.org).

Tabla 5: *Algunas enzimas proteolíticas y sus aminoácidos dianas.*

Enzima	Localización de rotura
Tripsina	C-terminal de Lys y Arg
Quimotripsina	C-terminal de Tyr, Phe, Trp, Leu, Met, Asn y Gln
Pepsina	N-terminal de Tyr, Phe, Trp
Termolisina	N-terminal de Ile, Leu y Val

El siguiente paso es la identificación de la proteína, que depende de si está o no presente en las bases de datos. Si las secuencias de un organismo están registradas en bases de datos, los algoritmos traducen los criterios de búsqueda (masas y secuencias de péptidos, coordenadas pI-Mw, etc...) y permiten identificar las proteínas aisladas con la información disponible en las bases de datos públicas. Sin embargo, si sus secuencias no están en las bases de datos, hay que recurrir a técnicas más costosas como la secuenciación *de novo* por MS en tándem o la degradación de Edman.

III.4.1 Electroforesis bidimensional

La 2-DE separa las proteínas por su pI y masa molecular (Fig. 15). La mayoría de los estudios proteómicos que analizan expresión diferencial entre dos situaciones usan la 2-DE, ésta permite resolver ~10.000 proteínas (Gorg et al., 2004).

Antes de la separación 2-DE, la muestra se solubiliza, desnaturaliza y reduce, para romper las interacciones entre las proteínas, y eliminar interferencias. El proceso se hace en condiciones desnaturalizantes para evitar las interacciones entre las proteínas (Molloy, 2000). En la separación en dos dimensiones se distinguen 2 fases:

Isoelectroenfoque (Fig. 15.A): en un gel de poliacrilamida con gradiente inmovilizado de pH y anfolitos en solución. Se añaden las proteínas de la muestra y se aplica un campo eléctrico, con el polo – en el extremo de pH ácido y el + en el de pH básico. Las proteínas con carga positiva al pH de separación, migran al polo – hasta llegar a su pI (carga 0) y se detienen. Aquellas con carga negativa migran al polo + hasta alcanzar su pI. Las tiras IPG (Inmovilized pH Gradients) estabilizadas en un soporte, aumentan la reproducibilidad de la 2-DE, haciéndola un método fiable para obtener “mapas de proteínas” (Fey and Larsen, 2001; Ong and Pandey, 2001).

SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) (Fig 15 B): la tira IPG ya separada se coloca sobre un gel de poliacrilamida con SDS (dodecil sulfato de sodio)

y se aplica de nuevo un campo eléctrico, con el electrodo positivo abajo. La carga negativa del SDS domina a la de las proteínas, y todas tienen carga negativa con relación carga/masa constante (SDS/proteína 1,4/1) que las hace migrar al polo +. Las proteínas mayores sufren más resistencia a su desplazamiento en el gel y quedan arriba. Las proteínas migran a una distancia que es logarítmicamente inversa a su peso.

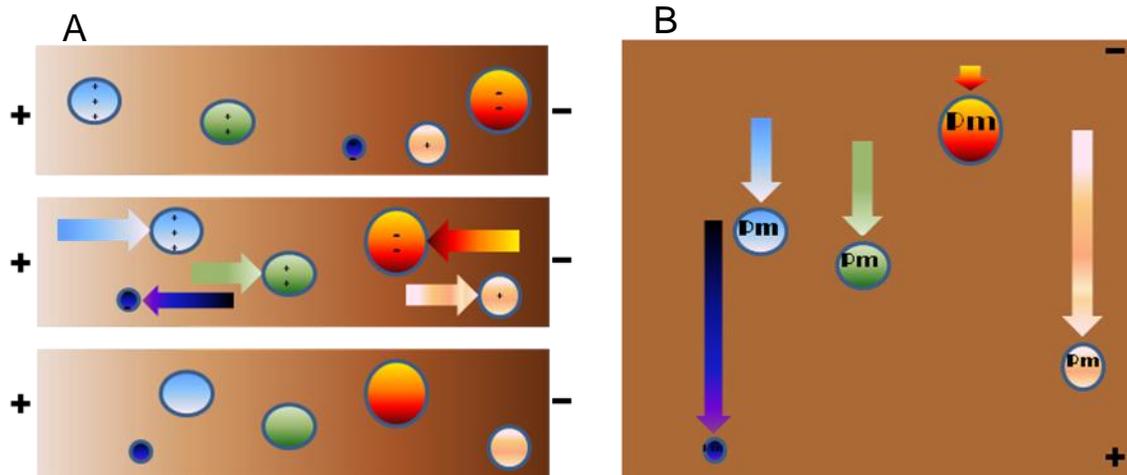


Fig. 15. *Esquema de la 2-DE.* A) Isoelectroenfoque (1ª dimensión) donde las proteínas se separan por su pI. B) SDS-PAGE (2ª dimensión) donde se separan por su masa.

Para obtener una resolución máxima de las proteínas y estudiar proteínas de baja concentración hay que prefraccionar la muestra, usar IPGs con rangos de pH estrechos (las proteínas suelen tener pI 3-13) y optimizar la carga proteica (Barrier and Mirkes, 2005).

Tras la separación, el gel se tiñe para visualizar las proteínas. Los métodos de tinción más usados son Coomassie y plata, el más sensible con un límite de detección de 0,1 ng de proteína por mancha, aunque de rango dinámico muy bajo y no es una tinción a punto final, siendo necesario controlar los tiempos de teñido (Görg et al., 2000). La tinción fluorescente Sypro Ruby, a punto final, tiene tres órdenes de magnitud de rango dinámico y sensibilidad similar a la plata, siendo el más usado en análisis cuantitativo (Berggren et al., 2000; Lopez et al., 2000; Berggren et al., 2002; Nishihara and Champion, 2002; Lanne and Panfilov, 2005). El DIGE (diferencial in gel electrophoresis), marca 2 muestras distintas antes de su separación con 2 fluoróforos que emiten a distinta longitud de onda, con lo que ambas pueden separarse y visualizarse en un mismo gel. Un tercer fluoróforo sirve de control interno y normaliza la cuantificación mejorando el estudio de la expresión diferencial en diferentes muestras (Lilley and Friedman, 2004; Van den Bergh and Arckens, 2004). Todos estos métodos son compatibles con el análisis MS. La adquisición

y digitalización de imágenes se realiza por escáner, cámaras CCD, etc (Fig. 16). La automatización del proceso ha aumentado mucho su reproducibilidad (Gorg et al., 2004).

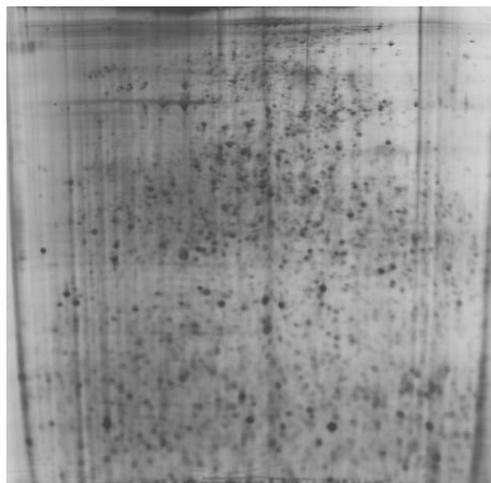


Fig. 16. *Imagen digitalizada de un gel 2-DE teñido con plata* (densitómetro GS-800, Bio-Rad). Las manchas representan las proteínas presentes en nuestra muestra.

III.4.2. Análisis de imágenes 2D

El análisis de geles 2-DE sufre varios problemas de delimitación y visualización de las manchas: 1) Confusión entre distintas proteínas presentes en una mancha, o entre manchas vecinas sin buena separación con zonas oscuras entre ellas. 2) “Streaking”, con desplazamientos en ambas dimensiones relacionados con la carga de proteína o su reducción incompleta. 3) Falta de uniformidad del fondo.

Al analizar varios geles a la vez para detectar variaciones de expresión proteica, surgen nuevos problemas. Hay que comprobar qué manchas aparecen o desaparecen de un gel a otro, cuáles cambian de intensidad (abundancia), y cuáles se desplazan en el gel (cambio de pI por alguna modificación postraducional). Varios paquetes de software (PDQuest, Proteinweaver, Melanie, etc.) ayudan a resolver los problemas que surgen en el análisis de imágenes 2D. El tiempo empleado para comparar geles y determinar los cambios de expresión entre ellos depende del número de geles y de spots que aparezcan en cada uno, y la deformación debida a la técnica experimental, como son la movilidad electroforética, dependencia del tiempo de revelado, etc.

El análisis de imagen puede separarse en los siguientes pasos sucesivos:

1. Preprocesamiento de imágenes (normalización, recorte y eliminación de fondo).
2. Detección y cuantificación de spots.
3. Alineamiento de las imágenes, tras establecer ciertos puntos de referencia.

4. Emparejamiento automático de los spots detectados.
5. Identificación de la expresión diferencial.
6. Presentación de los datos e interpretación.

La detección de spots consiste en distinguir sobre el fondo cada mancha que aparece en el gel 2D. El resultado es una lista de centros de manchas con intensidades y propiedades geométricas. Cada una puede variar en tamaño e intensidad lo que dificulta distinguirla del ruido y a veces del “streaking”. Además, grupos muy saturados de spots (alta intensidad) dificultan la observación de los límites entre estos.

El siguiente paso es extraer la información de cada spot (area, Densidad óptica (DO) del spot, DO integrada, Intensidad de spot integrada, Densidad Gaussiana integrada) para cuantificar su expresión. El porcentaje de DO (normalizado frente al total del gel) suele usarse para cuantificar la expresión de proteínas.

Una de las metas en proteómica es encontrar diferencias de expresión entre muestras de distintas condiciones. Para ello, los geles deben alinearse, emparejar las manchas, y buscar las diferencias entre ellos, aparición, eliminación o variaciones en las intensidades de las manchas.

Los métodos de detección de diferencias significativas incluyen test de Mann-Whitney (alternativa no paramétrica que no exige distribuciones gaussianas), t- de Student y el de varianza (ANOVA). El test-t mide el significado de la diferencia de medias entre dos distribuciones gaussianas. Para cada spot se comparan las medias de intensidad de los geles referencia y problema, y si las diferencias tienen un nivel de confianza superior al seleccionado por el usuario (en nuestro caso >0.99), la expresión diferencial se considera significativa. El ANOVA es el test-t generalizado para comparar más de dos condiciones, asumiendo que las poblaciones son gaussianas y con la misma varianza.

III.4.3. Identificación de proteínas

La espectrometría de masas (MS) identifica proteínas a gran escala con gran rapidez y alta sensibilidad (Gygi and Aebersold, 2000; Fey and Larsen, 2001). La MS analiza péptidos separados por 2-DE o HPLC, produce iones en fase gaseosa, los clasifica por su masa-carga (m/z) e intensidad y determina su masa molecular relativa (M_r), abundancia y estructura química.

Hay varios tipos de espectrómetros de masas combinando 3 componentes: 1) Fuente iónica, donde se ioniza la muestra, por ionización láser asistida por matriz (MALDI, “Matrix Assisted-Laser Desorption/Ionization”) ó electrospray (ESI, “ElectroSpray

Ionization”). 2) Analizador, donde los iones se aceleran y separan por su relación m/z . Pueden ser de tiempo de vuelo (TOF), cuadrupolo (Q), trampa iónica (IT) y resonancia ciclotrónica (ICR). 3) Detector, que muestra el valor m/z y abundancia de cada ion.

Para la identificación de proteínas se han desarrollado dos estrategias:

A) Huella peptídica (PMF: Peptide mass fingerprinting) para análisis a gran escala de organismos con genoma secuenciado (Gygi and Aebersold, 2000). La digestión de cada proteína genera un conjunto de péptidos o huella peptídica, dado por un espectrómetro tipo MALDI-TOF, de la cual se pueden identificar directamente proteínas, buscando la homología de las masas de los fragmentos de una proteína y los generados “*in silico*” a partir de las secuencias incluidas en las bases de datos.

B) Secuenciación *de novo*, usada en organismos no secuenciados. A partir de secuencias parciales (etiqueta de secuencia) de algunos péptidos, procedentes de un espectrómetro de masas en tandem (MS/MS), se buscan homologías frente a proteínas de otros organismos presentes en las bases de datos (Mann and Pandey, 2001).

MALDI-TOF y ESI MS/MS son las técnicas más usadas por su exitosa aplicación (Romero-Ruiz et al., 2006; Montes-Nieto et al., 2007). En Internet hay herramientas bioinformáticas disponibles (PeptideSearch, PepIdent, TagIdent, Profound y Mascot) que correlacionan las secuencias obtenidas por MS y la información contenida en las bases de datos para la identificación de las proteínas (Vihinen, 2001).

Los microchips de proteínas, LC-MS/MS o CE-MS/MS son las herramientas con mayor auge en la identificación automática de miles de proteínas (Barrier and Mirkes, 2005; LaBaer and Ramachandran, 2005; Simpson and Smith, 2005; Stutz, 2005). Todo ello, reforzado por el avance de las técnicas de separación, el análisis por MS, y ampliación de las herramientas y las bases de datos bioinformáticas.

III.4.4. Aplicación de la proteómica a estudios de contaminación ambiental

El medio ambiente está expuesto a una mezcla compleja de contaminantes. La toxicidad de una mezcla difiere de la suma de sus componentes pues hay efectos sinérgicos (Walker, 1998). Los tests ecotoxicológicos no solucionan el análisis de mezclas de contaminantes ambientales al estar restringidos a compuestos individuales. Una estrategia mejor para evaluar la contaminación de un ecosistema, sería determinar los contaminantes en la zona de estudio, buscar una especie bioindicadora y medir en ella varios biomarcadores (Walker, 1998; Mumtaz et al., 2002)

Las respuestas de los organismos a las situaciones de estrés se usan como biomarcadores convencionales de contaminación. Los más sensibles y tempranos son los moleculares (Lopez-Barea, 1995). La toxicidad de los contaminantes provoca alteraciones en los seres vivos, que pueden ser evaluadas por baterías de biomarcadores convencionales que están involucrados en los mecanismos de toxicidad. Pero pueden existir otras proteínas, también afectadas por los contaminantes, pero cuya relación con los contaminantes aún se desconoce.

La proteómica permite identificar proteínas de expresión alterada por la presencia de contaminantes sin requerir conocimientos previos de sus mecanismos de toxicidad, y puede ser útil en la evaluación de ecosistemas (Snape et al., 2004). La Proteómica Ambiental, aplicación de técnicas proteómicas al medio ambiente en la búsqueda de nuevos biomarcadores de contaminación ha permitido mejorar el seguimiento y prevención de episodios de contaminación (Lopez-Barea and Gomez-Ariza, 2006).

Los estudios medioambientales utilizan organismos no secuenciados. Esto dificulta la identificación de proteínas, que puedan ser potenciales biomarcadores, y requiere acudir a la secuenciación “*de novo*”. De hecho, los estudios de expresión diferencial de proteínas en situaciones ambientalmente diferentes pueden servir como biomarcador de contaminación de alerta temprana, sin tener que identificar las proteínas, específicos de un determinado contaminante o mezcla de ellos (Rodriguez-Ortega et al., 2003; Knigge et al., 2004). El conjunto de proteínas cuya expresión se altera en cierta condición respecto de un control se denomina (PES, “protein expresión signatures”) (Shepard et al., 2000) El análisis 2-DE en chirlas expuestas a contaminantes (Rodriguez-Ortega et al., 2003) coquinas de fango procedentes de distintas zonas del estuario del Guadalquivir (Romero-Ruiz et al., 2006) y *Mus spretus* procedentes de Doñana y del Estero de Domingo Rubio (Montes-Nieto et al., 2007) identificó un conjunto de proteínas cuya regulación estaba condicionada por diferentes factores medioambientales. La identificación y caracterización de estas proteínas apoya y confirma el uso de la PES como biomarcadores en los estudios ambientales y su utilidad en la identificación de nuevos biomarcadores y ampliación de los mecanismos de toxicidad. Los microchips de proteínas y la tecnología SELDI “Surface-enhanced laser desorption/ionization” se usan también en la búsqueda de nuevos PES en mejillones expuestos a metales pesados y PAHs (Knigge et al., 2004).

El objetivo proteómico de este trabajo es obtener el mapa de expresión proteica en músculo, branquias y tejido nervioso del cangrejo *P. clarkii* y obtener las PES tipo de un tratamiento (exposición a plaguicidas OPs/CMs) o de los diferentes puntos de muestreo

(referencia /problema) del Parque Nacional de Doñana, con el análisis de geles 2-DE. Las PES características de cada condición pueden considerarse en sí mismas biomarcadores de contaminación medioambiental.

IV. DOÑANA

La Reserva Natural de Doñana, un espacio protegido de >100.000 Ha, está situada al Norte del Estuario del Guadalquivir (SO de España) entre las provincias de Huelva, Sevilla y Cádiz (Fernández, 1982). Dentro de ella está el Parque Nacional de Doñana (PND) con 54.252 Ha. uno de los humedales más importantes de Europa, integrado en el Convenio de Ramsar para la protección de los humedales, reconocido por la UNESCO primero como Reserva de la Biosfera y luego como Patrimonio de la Humanidad. Además, unas 20.000 Ha. forman la Zona de Protección del PND.

El PND situado sobre el acuífero Almonte-Marismas, del río Tinto al Guadalquivir, ocupa 2.500 Km² en las provincias de Huelva y Sevilla. El drenaje natural del acuífero se produce a través del río Guadiamar, los arroyos de La Rocina y El Partido, y las propias marismas. Sobre el acuífero se asienta una población de 185.000 habitantes distribuidos en 22 núcleos urbanos (Porrás Martín, 1985). Doñana se ve amenazada por las actividades urbanas, agrícolas, industriales y mineras (Albaiges et al., 1987).

Es un santuario de vida salvaje con > 800 especies de plantas y 400 de animales (Grimalt et al., 1999). Entre los vertebrados destacan las aves (>300 especies); de gran interés, por su delicada situación, son la malvasía, la cerceta pardilla, el calamón o la gaviota picofina. Hay además 33 especies de mamíferos, como el gamo, el ciervo, el meloncillo, la nutria, la jineta, el conejo, 12 de peces y 30 de reptiles y anfibios. El PND destaca por ser un refugio para la supervivencia de importantes especies faunísticas en peligro de extinción, como el linco ibérico y el águila imperial.

Doñana alberga esta gran variedad biológica por la diversidad de sus ecosistemas, playa, dunas vivas, cotos o arenas estabilizadas, marisma, y zona de transición entre arenas y arcillas o “vera”. El viento transporta arena de la playa hacia el interior, formando las dunas móviles. Los “cotos”, el paisaje más característico del PND, son un espeso matorral donde aparecen zonas aisladas de alcornoques, madroño, sabina y acebuche. La “vera” es uno de los biotopos más ricos y productivos de Doñana, cuyos alcornoques son utilizados por colonias de aves para nidificar. La marisma, el ecosistema más sobresaliente del PND, destaca por su escaso relieve, la naturaleza arcillosa de suelo y su

acentuada estacionalidad hídrica, inundada por aguas de origen pluvial, fluvial y mareal (Castroviejo, 1993).

Tradicionalmente, los aportes de agua de la marisma procedían de la lluvia, los arroyos del NO (Rocina y Partido) o del NE (Guadamar) y el desbordamiento del Guadalquivir. Su sistema hidrológico más importante era la Rocina-Madre de la Marisma-Brazo de la Torre, que reunía aportes fluviales del NO y NE (Castroviejo, 1993). La construcción de varios muros eliminó los aportes del Guadamar, sobre todo el caño Travieso, y aisló la marisma por el S de los del Guadalquivir, restringiendo la entrada de agua a los aportes de La Rocina y El Partido, y las lluvias. Tras el vertido de Aznalcollar se activaron planes que se venían elaborando para la regeneración hídrica de Doñana, que se plasmaron en el Plan Doñana 2005. Éste devolverá a la marisma un funcionamiento hídrico más natural, al mejorar los aportes por la Rocina y el Partido, restaurar la marisma al N de los muros de la Confederación y la FAO, recuperar los caños Travieso y Guadamar, eliminar los diques de Entremuros, regenerar el funcionamiento del Brazo de la Torre, y recuperar los intercambios con el Guadalquivir (Saura et al., 2001). Todas estas actuaciones pretenden una marisma con menos intervención, menos aislada, que osmóticamente intercambie aguas con las áreas colindantes, penetrando por los caños naturales para desbordarse lentamente, donde el régimen de aguas corrientes vuelva a tener protagonismo y las aguas estabilizadas sean la excepción. Una marisma en que el agua entre del inicio del invierno al fin de la primavera de forma lenta y suave, tras inundar otros terrenos de marisma. Al tiempo que restaura los aportes de agua superficial, el plan elimina las barreras que aislaban la marisma de los contaminantes procedentes de zonas agrícolas cercanas y los ríos Guadamar y Guadalquivir. Pero también deja Doñana más vulnerable a la contaminación derivada de las actividades humanas de sus alrededores. De hecho, tras la amenaza que supuso el accidente de las minas de pirita en Aznalcollar, en abril de 1998, se ha monitorizado la posible contaminación por metales del PND. Estas evaluaciones pusieron de manifiesto la amenaza que supone la práctica agrícola (arroz, cítricos y fresas) en el entorno de Doñana y el uso de plaguicidas ligado a ésta (Bonilla-Valverde et al., 2004; Vioque-Fernandez et al., 2007a).

IV.I. CONTAMINACIÓN EN DOÑANA

Las amenazas al PND son muchas. Las actividades agrícolas son un motor importante en la economía de la zona pero afectan Doñana de 3 formas: extracción de agua subterránea para regadíos, uso de agua superficial para arrozales, y contaminación por

fertilizantes y plaguicidas. En su entorno se realizan varios cultivos. Al NE, 35.000 Ha de marisma se dedican al cultivo de arroz y en las arenas estabilizadas del NO, 4.000 Ha al de fresa. Junto a la Rocina y el Partido se iniciaron cultivos de “nueva agricultura”. En Partido se han encontrado valores altos de nutrientes (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{3-}) y metales (Al y Cr), en niveles que pueden deberse al uso de fertilizantes (Tovar-Sanchez et al., 2005), y niveles de plaguicidas en Doñana y alrededores (Vioque-Fernandez et al., 2007a). Además, las prácticas agropecuarias muy extendidas en la zona, dado el gran número de cabezas de ganado y hectáreas de regadío, probablemente sean causa de la gran cantidad de compuestos nitrogenados presentes en aguas subterráneas (Porrás Martín, 1985).

También destacan las numerosas almazaras, industrias de procesado de uva y vegetales e industrias cárnicas y lácteas. Los efluentes de estas industrias amenazan al Partido (Arambarri et al., 1996), y al curso bajo del Guadiamar (Castroviejo, 1993; Alonso et al., 2004). Además, las aguas residuales de muchos municipios se vertían sin depurar sobre el acuífero, afectando al Guadiamar y al Partido (Arambarri et al., 1996; Manzano, 1999) aunque ya se han construido varias estaciones depuradoras de aguas residuales.

Otra fuente potencial de contaminación está a 45 Km al NO del PND, a orillas de los ríos Odiel y Tinto. Los Polos Industriales de Huelva cuentan, entre otras, con numerosas industrias de transformación minera, un complejo petroquímico, una central térmica y una fábrica de celulosa, cuyos contaminantes pueden alcanzar Doñana por las corrientes marinas o llevados por vía eólica (Albaiges et al., 1987; Castroviejo, 1993).

Al N de Doñana, se explotaban desde 1979 las minas de pirita de Aznalcóllar, cuyos subproductos se almacenaban en una balsa de estériles, que tras lluvias intensas, liberaba metales muy móviles al río Guadiamar arrastrándolos aguas abajo (Arambarri et al., 1996). En 1998, tras el desastre de Aznalcóllar se hallaron Pb, Cd, As, Fe y Mn a lo largo del río Guadiamar (Bonilla-Valverde et al., 2004).

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 reciente 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 (Oñate et al., 2003). 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.

V. OBJETIVOS DEL TRABAJO

La presente Tesis tiene como objetivo general la evaluación y seguimiento de la contaminación ambiental mediante el uso de biomarcadores. En concreto, la valoración de la calidad ambiental del PND usando como bioindicador *Procambarus clarkii*, un cangrejo ampliamente extendido en El Parque. El desarrollo de dicho objetivo engloba:

1. Seguimiento y evaluación del riesgo de la contaminación en ocho ecosistemas acuáticos de Doñana: 6 en el entorno del Parque, con niveles potenciales de contaminación y cuyas aguas abastecen al PND, y dos zonas en el interior del mismo, *a priori* libres de contaminantes, empleadas como referencia. Para ello, usamos una batería de biomarcadores de stress oxidativo, previamente establecidos y validados por nuestro grupo, esterasas, específicos de OPs y CMs usados en la principal fuente actual de contaminantes en esta zona y señales de expresión proteica como nuevos y específicos biomarcadores bioquímicos.
2. Estudio de la influencia de la estacionalidad en los niveles de los biomarcadores como factor que puede alterar las respuestas de los mismos a los contaminantes.
3. Evaluación y puesta a punto y reactivación de las actividades esterasas (AChE, BChE y CbE) en diferentes tejidos del cangrejo, y su validación en muestras de campo.
4. Respuesta de la batería de biomarcadores bioquímicos, a la exposición de dos tipos de plaguicidas, uno de tipo organofosforado (clorpyrifos) y otro de tipo carbamato (carbaril), de cangrejos, en condiciones de laboratorio controladas.
5. Búsqueda de nuevos biomarcadores de contaminación mediante el análisis proteómico, estudiando los cambios en los perfiles de expresión proteica de cangrejos expuestos a dos plaguicidas modelo (clorpyrifos y carbaril) en tejido nervioso y branquias, así como en branquias de cangrejos de campo procedentes de las seis zonas problema y las dos zonas de referencia.

Materiales y métodos

I. ESTUDIOS DE CAMPO Y ÁREAS DE MUESTREO

La contaminación del PND se monitorizó en cangrejos capturados en primavera (mayo-junio) y otoño (octubre-noviembre) de 2003 y 2004 en seis puntos situados en los alrededores del PND, **ROC y BER** (en el curso del arroyo La Rocina), **PAR y AJO** (en el del arroyo del Partido), **VIL y MAT** (en los arrozales de Villafranco, al este del PND) y dos puntos ubicados en el interior del Parque, **LDP y LD** (Tabla 6, Fig.17).

Tabla 6. *Áreas de estudio, coordenadas UTM y principales características ecológicas.*

Area (código) (localización)	Coordenadas UTM	Características Ecológicas
Rocina (ROC) (Curso alto del arroyo la Rocina)	X = 178653 Y = 4119937	Problema, influenciado por los cultivos de fresa
Bernabé (BER) (Arroyo de la Rocina, cerca de la aldea de "El Rocío")	X = 187036 Y = 4116086	Problema, influenciado por los cultivos de cítricos
Partido (PAR) (Curso alto del arroyo el Partido)	X = 191173 Y = 4124977	Problema, influenciado por los cultivos de cítricos
Ajolí (AJO) (Arroyo del Partido, cerca de la aldea)	X = 192352 Y = 4115565	Problema, influenciado por los cultivos de cítricos
Villafranco (VIL) (Arroyo Guadiamar, cerca de "Villafranco del Guadalquivir")	X = 212496 Y = 4112103	Problema, influenciado por los cultivos de arroz
El Matochal (MAT) (Arroyo Guadiamar, cerca del límite del PND)	X = 208681 Y = 4102207	Problema, influenciado por los cultivos de arroz
Laguna Dulce (LD) (Reserva Biológica Doñana)	X = 189947 Y = 4098578	Referencia
Lucio del Palacio (LDP) (Reserva Biológica Doñana)	X = 193800 Y = 4099515	Referencia

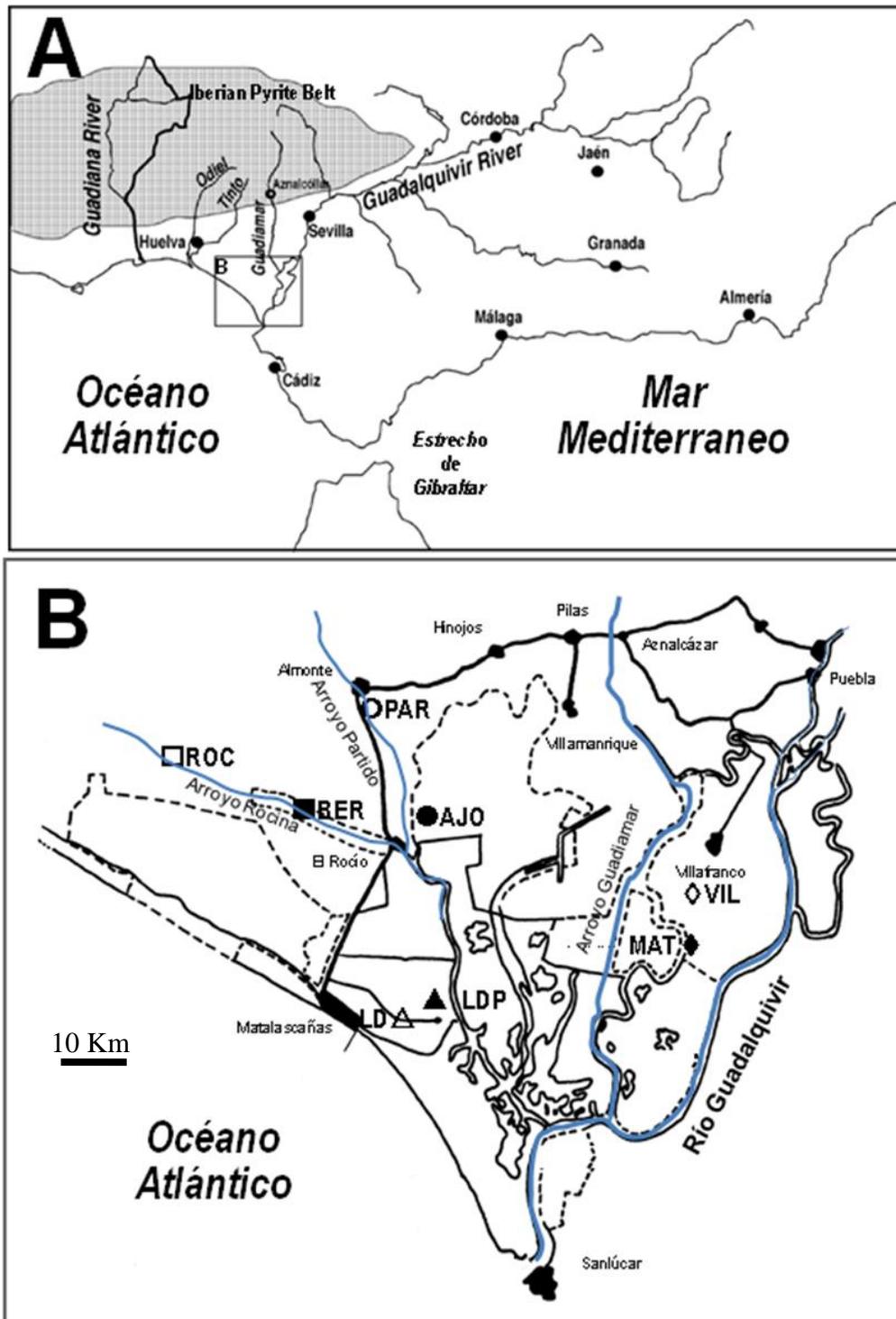


Fig. 17. *Localización geográfica de las áreas de muestreo de cangrejo.* **A**– Este de Portugal y Andalucía, cursos de los ríos Guadalquivir y Guadiana, Estrecho de Gibraltar, y la localización de 7 ciudades andaluzas.; El cuadro B se amplía en la siguiente figura. **B**– Parque Nacional de Doñana y sus alrededores; localización de 2 sitios problema en el curso de la “Rocina” (**ROC**, **BER**), 2 en el curso del “Partido” (**PAR**, **AJO**), 2 cerca del arroyo Guadiamar (**VIL**, **MAT**), y 2 sitios de referencia en la Reserva Biológica de Doñana (**LD**, **LDP**).

En las cuatro campañas se capturó un total de ~600 cangrejos (~20 por campaña y sitio) de 10-30 gr (Tabla 7). A cada uno se le asignó un código que indicaba la zona de procedencia y la fecha de muestreo. Tras su captura los cangrejos fueron pesados, sexados y diseccionados. La *glándula digestiva*, dos glándulas anaranjadas que ocupan la mayor parte del celoma en la región cefalotorácica, y el *músculo abdominal* se pesaron individualmente y el *tejido nervioso nervioso*, 2 cordones paralelos muy próximos en la línea medio ventral con seis ganglios abdominales, se agruparon en un único lote por cada zona estudiada. Los tejidos se trituraron en N₂ líquido y almacenaron a -80° C en el laboratorio de la Reserva Biológica de Doñana hasta su traslado la Universidad de Córdoba.

Table 7. *Número de cangrejos capturados en cada campaña.*

Punto de muestreo	Primavera 03	Otoño 03	Primavera 04	Otoño 04
Rocina (ROC)	20	21	20	20
Bernabé (BER)	20	21	19	20
Partido (PAR)	16	22	19	20
Ajolí (AJO)	22	16	20	20
Villafranco (VIL)	21	20	26	21
El Matochal(MAT)	17	14	20	17
Laguna Dulce (LD)	20	19	20	0
Lucio del Palacio(LDP)	20	21	19	23

Los cangrejos se capturaron usando nasas tubulares de malla de plástico, cedidas por el personal de la Reserva Biológica de Doñana (Fig. 18), y como cebo utilizamos una mezcla de sardinas batidas en aceite. Las nasas se recogieron cada día para evitar estrés a los cangrejos capturados y que algún anfibio entrase accidentalmente en el dispositivo.



Fig. 18. *Nasas de muestreo para cangrejo con cebo en su interior.*

II. REACTIVOS

Acetonitrilo, acetil-tiocolina yodada, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido 5,5-ditiobis-2-dinitrobenzoico (DTNB), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), butiril-tiocolina yodada, carbaril, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), clorpirifos, ditioneitol (DTT), eserina, 7-etoxi-resorufina, fenilmetanosulfonilo-fluor (PMSF), feniltioacetato, GSH, GSSG, iso-OMPA, malation, mono-Bromobimano (mBBBr), β -nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reducido (NADPH), 2-PAM, peróxido de hidrógeno, resorufina, seroalbumina bovina y yodoacetamida fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co (St. Louis, MO, USA). 3-[(3-Cloroamidopropil)-dimetilamonio]-1-propansulfonato (CHAPS), glicerol, glicina, immobiline Dry- Strips®, Pharmalyte 3–10, sodio dodecil sulfato (SDS), tiourea, Tris aminometano (Tris) y urea were de Amersham GE Healthcare. Duracril fue de Genomic Solutions® Ltd. Bradford y aceite mineral fueron de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Todos los químicos utilizados tuvieron calidad analítica y el agua usada fue Milli-Q (Millipore®).

III. EXPOSICIÓN *IN VIVO* A CLORPIRIFOS Y A CARBARIL

Para estudiar los efectos que causan en las actividades esterasas y otros biomarcadores de estrés oxidativo de *P. clarkii* dos plaguicidas modelo y estudiar su posible recuperación tras retirarlo, los animales fueron expuestos *in vivo* a corto plazo a dos concentraciones de clorpirifos (OP) y carbaril (CM).

Animales cedidos por la empresa SEAFOOD, S.L. se expusieron a 0, 12 y 24 $\mu\text{g/L}$ de clorpirifos ó a 0, 1 y 2 mg/L en el caso del carbaril, concentraciones que corresponden a las dosis $\frac{1}{2}$ LC50 y LC50 para *P. clarkii* tras 5 días, de acuerdo con los datos de la EPA (Environmental Protection Agency).

Las exposiciones se realizaron en tres tanques de PVC con capacidad para 100 L de agua cada uno, cedidos por el CIFPA (Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola) “El Toruño” (Puerto Sta. María, Cádiz). A ellos se acopló un sistema de mangueras de circulación de agua previamente desclorada. Se construyeron 3 jaulas, una por tanque, con mallas de plástico de 1cm de poro con 21 compartimentos de $\sim 100 \text{ cm}^2$ cada uno, que permitían situar un cangrejo en cada compartimento evitando el canibalismo (Fig. 19).

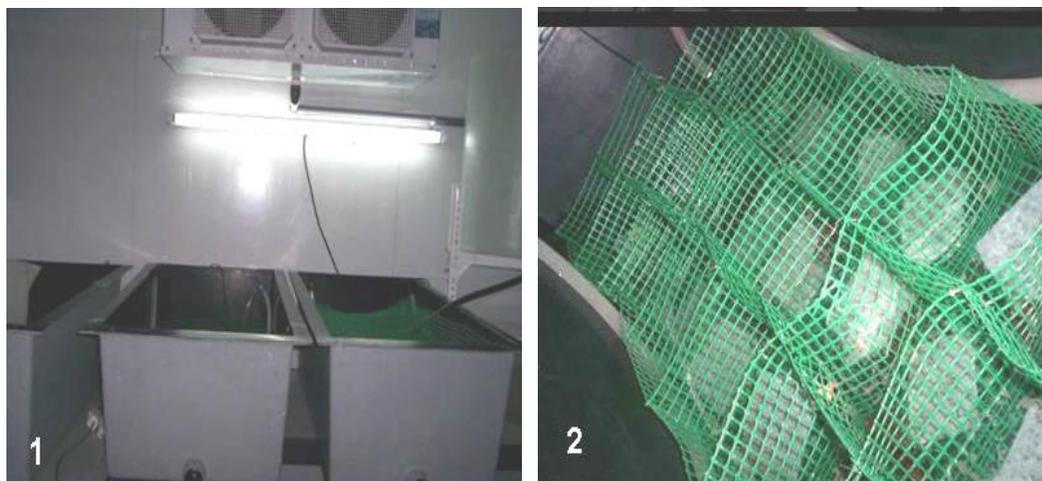


Fig. 19. *Exposición a plaguicidas.* Los tres tanques (1) y las jaulas con 20 compartimentos (2).

Los técnicos de SEAFOOD sugirieron alimentar los cangrejos una vez al día con comida para carpas y mantenerlos a 8 – 9° C. Sin embargo, en esas condiciones los animales se movían poco, probablemente debido a la ralentización de su metabolismo por la baja temperatura. Por ello, antes de iniciar los experimentos de exposición, probamos diferentes temperaturas. A 25 °C, observamos alta mortalidad (5-8 animales/día) y aumento de una unidad de pH del agua cada día. Por ello, consideramos 18 °C la temperatura óptima para el experimento, pues los cangrejos estaban activos, tenían baja mortalidad, y el pH del agua no sufría grandes alteraciones (7-7,3).

Los experimentos se realizaron dentro de una cámara refrigerada a 18°. Los tanques se llenaron con 30L de agua desclorada, que se renovó cada 2 días, hasta una altura de ~20 cm. De esta forma los cangrejos no quedaban totalmente sumergidos, pues tienen hábitos acuáticos y terrestres. Dentro de cada tanque, sumergida en el agua del compartimento libre, una bomba de membrana recirculaba y oxigenaba el agua. La iluminación se controlaba con un temporizador, estableciendo un fotoperiodo de 12 horas de luz/12 de oscuridad. Los cangrejos fueron alimentados diariamente con comida para peces de la marca “Tetra”.

Tras optimizar las condiciones de trabajo se iniciaron los experimentos de exposición controlada. En ambos experimentos se utilizaron un total de 120 cangrejos, 20 por tanque. En ellos el tanque 1 se usaba como control, sin añadir plaguicida al agua. En la exposición al OP, se añadieron 12 y 24 µg/L de clorpirifos a los tanques 2 y 3, respectivamente. En la exposición al CM, se añadió carbaril a concentraciones 1/2 LC50 (1 mg/L) y LC50 (2 mg/L). Antes de iniciar las exposiciones, los cangrejos se aclimataron a las condiciones establecidas durante 5 días. Tras la aclimatación, de cada tanque se

tomaron 2 animales, y los 6 se reunieron formaron el grupo de tiempo cero (T0). Luego, se añadió el plaguicida adecuado a las concentraciones señaladas –tanques 2 ($\frac{1}{2}$ LC50) y 3 (LC50)– al tiempo que se cambiaba de cada tanque, que se renovó luego cada dos días. A los 2 y 5 días de exposición a cada plaguicida, se cogieron 5 cangrejos de cada tanque (control, $\frac{1}{2}$ LC50 y LC50). A los 7 días de exposición, los tanques se limpiaron profundamente para eliminar restos de plaguicida y los cangrejos restantes se devolvieron a sus respectivos tanques, donde estuvieron otros 7 días en ausencia plaguicida. Esta fase de descontaminación/depuración pretendía estudiar si los biomarcadores alterados durante la exposición tenían capacidad de recuperación, grupo que se denominó “recuperación 7 días”. Conviene destacar que el agua y los tratamientos se cambiaban cada 2 días.

Los cangrejos tomados en cada uno de los periodos, T0, 2 y 5 días de exposición, y 7 días de recuperación, fueron diseccionados y sus glándulas digestivas, branquias, y tejidos nervioso y muscular triturados en un mortero de cerámica bajo N₂ líquido y se mantuvieron congelados a -80°, hasta su análisis.

IV. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Todos los reactivos usados fueron de alta pureza. Cada análisis se realizó por triplicado simultáneamente. Salvo que se indique lo contrario, las actividades se midieron en cada individuo y solo se hicieron en forma conjunta en el caso del tejido nervioso, pues la cantidad de tejido obtenido de cada animal era insuficiente para su ensayo individual.

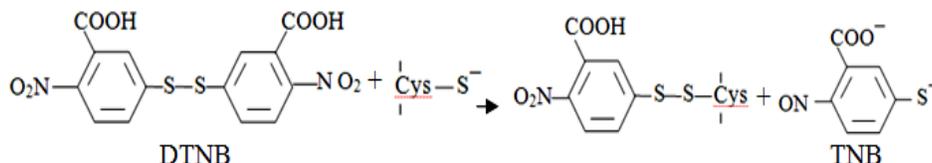
IV. 1. ACTIVIDADES ESTERASAS

IV. 1. 1.- Obtención de la extractos de para determinar actividad Esterasas

Las muestras de los diferentes tejidos se pesaron y homogeneizaron con un aparato Potter-Elvehjem con pistón de teflón, en tampón 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 a razón de 4 ml/g de tejido. La rotura se realizó en tres periodos de 30 s separados por intervalos de 30 s en hielo. El homogenado se centrifugó 30 min a 30000 × g. Las fracciones se distribuyeron en alícuotas y almacenaron a -80° C hasta su análisis. Para medir las formas unidas a membrana, se prepararon extractos en el mismo tampón pero con 0.5% de Triton X-100.

IV. 1. 2.- Acetil- (AChE, EC 3.1.1.7), Butiril- colinesterasa (BuChE, EC 3.1.1.8) y Carboxilesterasa (CbE, EC 3.1.1.1) (Ellman et al., 1961)

Las actividades se ensayaron espectrofotométricamente a 25° C, midiendo el aumento de absorbancia a 412 nm ($\epsilon = 13.6\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) siguiendo 2 min la reacción del DTNB con la tiocolina o tioacetato liberados por las esterasas, que genera el anion 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), amarillento que absorbe a 412nm según la reacción:



La mezcla de reacción contenía 100mM tampón Tris-HCl, pH 8, 10 mm de acetil- o butiril-tiocolina o 4.5mM fenil-S-tioacetato, 1mM DTNB y extracto citosólico, en un volumen final de 1 ml. El inhibidor Iso-OMPA, específico de BChE, solo se añadió en el ensayo de la AChE. Los ensayos de midieron siguiendo el $\Delta A_{412} \text{ min}^{-1}$ durante 2 minutos a 25°C. Las actividades se expresan como micromoles sustrato/minuto x mg proteína. Se ensayaron distintos volúmenes de extracto para establecer su rango lineal y optimizar el volumen de muestra a ensayar. También se ensayaron diferentes concentraciones de sustrato, para establecer su afinidad (K_m) y actividad máxima (V_{max}). El rango de concentración final de sustrato fue (0.5 – 50 mM) para AChE y BChE y (0.15 – 9.0 mM) para la CbE.

IV.1. 3.- Sensibilidad de AChE, CbE y BChE a diferentes compuestos

Los diferentes extractos se incubaron a T ambiente en tampón de homogenización conteniendo plaguicidas o inhibidores específicos. Para inhibir las AChE, BChE y CbE usamos PMSF como inhibidor general de las Ser-hidrolasas, y el iso- OMPA como inhibidor específico de la BChE. Como modelos de plaguicidas CMs, usamos eserina y carbaril y como ejemplos de plaguicidas OPs usamos malatión y clopirifos.

PMSF e iso-OMPA se disolvieron en isopropanol y etanol, respectivamente. Los plaguicidas carbaril y clopirifos en acetona, y el malatión y la eserina en etanol. Las soluciones stock se diluyeron con H₂O hasta obtener las concentraciones deseadas. Se hizo un control con el disolvente correspondiente en cada caso durante la incubación para determinar la hidrólisis espontánea y un control con el extracto sin tratar para comprobar su estabilidad.

Se optimizó el tiempo necesario para la inhibición extensiva de las enzimas. Para ello, se estudió la cinética de inhibición de las tres esterasas por cada uno de los

inhibidores estudiados La concentración de inhibidor (IC50) que inhibe 50 % la actividad se determino añadiendo diferentes concentraciones de plaguicida (2-10 mM PMSF, 0.1-2 mM iso-OMPA, 10^{-9} - 10^{-2} M carbaril, 10^{-9} - 10^{-2} M eserina, 10^{-5} - 10^{-1} M clorpirifos, 10^{-5} - 10^{-1} M malation) a cada tipo de extracto. Las actividades AChE, BChE y CbE se ensayaron por el método Ellman en los extractos tratados y sus controles. Cuando se indica se determinó el porcentaje de inhibición respecto al control en ausencia de inhibidor.

IV. 1. 4.- Reactivación in vitro de AChE y CbE inhibidas por clorpirifos y carbaril

La reactivación de las actividades AChE (t. nervioso) y CbE (glándula digestiva), inhibidas por clorpirifos y carbaril, por adición de 2-PAM o por dilución se estudió para desarrollar una metodología que permitiera discernir entre una exposición a OPs o CMs en *P. clarkii*. También se examinó el tiempo necesario para recobrar su actividad enzimática, previamente inhibida por plaguicidas, en presencia de diferentes concentraciones de 2-PAM, a distintas diluciones del extracto inhibido (1/30 y 1/60) y tras uno y dos pasos de ultrafiltración.

Para la reactivación de la AChE de un extracto de t. nervioso se tomaron tres alícuotas, una sirvió de control sin inhibir y otras dos se incubaron con 10^{-4} M carbaril 10 min ó 10^{-2} M clorpirifos 25 min a 25°C hasta su total inhibición. Tras la incubación, las muestras, control, +carbaril y +clorpirifos, se filtraron en centricones YM10 (Millipore®), 60 min a 12000 x g y 4°C, para eliminar el exceso de plaguicida y facilitar la reactivación. A continuación, la fracción retenida en la membrana se resuspendió en tampón de ensayo hasta el volumen de partida. Tras comprobar que no se perdía actividad AChE en la filtración se inició la reactivación. Cada alícuota, control sin inhibir, inhibida por OP o CMs, se dividió en dos. Una se diluyó 30 veces en 1mg ovoalbumina /ml tampón de ensayo y la otra en ese tampón con 0.5×10^{-3} M 2-PAM y se ensayó la AChE en cada una de ellas a lo largo de 4 horas.

La reactivación de la CbE fue igual al de la AChE pero las concentraciones de plaguicidas fueron menores, 5×10^{-5} M carbaril y 5×10^{-4} M clorpirifos, y la concentración de 2-PAM fue 10^{-3} M y la dilución usada para reactivar la inhibición por CA 1/50. El tiempo de reactividad fue de 120 min en todos los casos.

Finalmente, las preparaciones fueron sometidas a 2 ultrafiltraciones o diluciones de 50/60 veces para obtener una mejor retirada del plaguicida y facilitar la reactivación.

IV. 2. OTROS BIOMARCADORES

IV. 2. 1. Obtención de extractos

IV. 2. 1. 1. Obtención de extractos crudos de glándula digestiva

Todos los pasos se realizaron a 4° C. Las muestras de hepatopancreas se pesaron y homogeneizaron con un aparato Potter-Elvehjem con pistón de teflón, en tampón 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 que contenía 1 mM EDTA, 1 mM GSH y 1 mM PMSF, a razón de 4 ml/g. La rotura se realizó en tres periodos de 30 s separados por intervalos de 30 s en hielo. De estos homogenados se separaron alícuotas para medir MDA, y el resto se centrifugó 20 min a 9000 × g para eliminar los restos celulares gruesos y la capa de grasa. Los sobrenadantes fueron ultracentrifugados 1 h a 105000 × g. Las fracciones fueron distribuidas en alícuotas y almacenadas a -80° C hasta su análisis.

IV. 2. 1. 2. Obtención de fracción microsomal

Las muestras de cangrejo se pesaron, homogeneizaron y centrifugaron como se acaba de describir. Tras ultracentrifugar 1 h a 105000 × g, el precipitado se resuspendió en 1,15% KCl (el mismo volumen inicial) y se volvió a centrifugar a 105000 × g 30 min para eliminar los restos de contaminación citosólica. El precipitado microsomal se resuspendió en tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,5, que contenía 20% glicerol y 1 mM EDTA, a razón de 0,25 ml/g de tejido inicial. La preparación se pasó varias veces por una aguja de insulina, para facilitar la vesiculación microsomal. Las alícuotas se guardaron a -80°C hasta su análisis.

IV. 2. 1. 3. Preparación de la muestra para determinar metalotioneínas (MTs)

Los hepatopáncreas se homogeneizaron en un Ultraturax T25, en tampón 0.1 M Tris-HCl, pH 9.5 que contenía 1 mM DTT, 50 µM PMSF y 6 µM leupeptina (3 ml/g). Los homogenados se centrifugaron a 14000 x g 15 min y los sobrenadantes se ultracentrifugaron a 100.000 x g 1 h.

IV. 2. 1. 4. Preparación de la muestra para determinar glutatión (GSH y GSSG)

Las muestras de hepatopáncreas de cangrejo se pesaron y homogeneizaron usando un Potter-Elvehjem con pistón de teflón en 0,25 M ácido perclórico, a razón de 10 ml/g de tejido. Los homogenados se centrifugaron 4 min a 28000 × g, y los sobrenadantes se filtraron (filtro de 0.2 µm) y almacenaron a -80° C hasta su análisis en HPLC.

IV. 2. 2- Determinación de otros biomarcadores

Salvo que se indique lo contrario, una unidad (U) de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato en producto por minuto.

IV. 2. 2. 1. Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) (Beers and Sizer, 1952)

La actividad se ensayó espectrofotométricamente (Beckman DU 650), a 30° C, midiendo la disminución de absorbancia a 240 nm ($\epsilon = 43,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) debida a la desaparición del peróxido de hidrógeno, según la reacción: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
 La mezcla de reacción contenía 17 mM tampón fosfato potásico, pH 7, 20 mM H_2O_2 y 20 μl de extracto citosólico, en un volumen final de 1 ml. La reacción se midió 1 min a intervalos de 10 seg, integrando la pendiente observada. Como inhibidor específico de la catalasa se empleó 1 mM azida sódica.

IV. 2. 2. 2. Glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH, EC1.1.1.49) (Lörh & Waller, 1974)

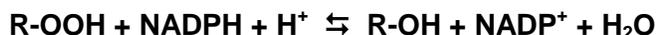
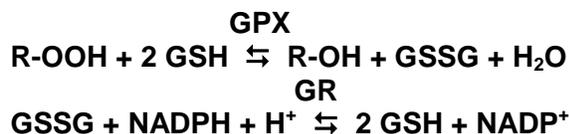
La actividad se midió espectrofotométricamente (Beckman DU 650), a 30° C, siguiendo el aumento de absorbancia a 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) debido a la reducción del NADP^+ , según la reacción:



La mezcla de reacción tenía 50 mM trietanolamina, pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,6 mM glucosa-6-P, 0,45 mM NADP^+ y 50 μl de extracto citosólico en un volumen final de 1 ml. La reacción se midió 2 min a intervalos de 12 seg integrando la pendiente observada.

IV. 2. 2. 3. Glutación peroxidasa (GPX, EC 1.11.1.9) (Flohé and Günzler, 1984)

El GSSG, generado por la reacción catalizada por la glutación peroxidasa (GPX), es reducido a GSH por un exceso de actividad glutación reductasa, según la reacción:



La actividad GPX se determinó espectrofotométricamente a 37° C midiendo el descenso de absorbancia a 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) debida a la oxidación del NADPH. La mezcla de reacción contenía 55 mM tampón fosfato potásico, pH 7,0, 1 mM EDTA, 0,24 U de glutación reductasa de levadura, 1 mM GSH, 0,15 mM NADPH, 2 mM hidroperóxido de cumeno y 20 μl de extracto citosólico en un volumen final de 1 ml. Antes de añadir el

NADPH y del peróxido, la muestra se incubó 5 min a 37° C para activar la peroxidasa. La oxidasa independiente de peróxido se determinó tras añadir NADPH, restándose de la obtenida en presencia del peróxido para determinar la actividad peroxidasa neta. La reacción se midió 5 min a intervalos de 30 seg integrando la pendiente observada entre 0.5 y 5 minutos.

IV. 2. 2. 4. Glutación transferasa (GST, EC 2.5.1.18) (Habig et al., 1974)

La actividad se midió espectrofotométricamente a 30° C, siguiendo el aumento de absorbancia a 340 nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), correspondiente a la formación de un complejo entre el glutatión reducido (GSH) y el 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB), según la reacción: **GSH + CDNB \rightleftharpoons CDNB-SG + HCl**

La mezcla de reacción contenía 0,2 M tampón fosfato potásico, pH 6,5, 2 mM GSH, 2 mM CDNB, y 20 μl de extracto citosólico en un volumen final de 1 ml. Tras incubar 2 min a temperatura ambiente la reacción se inició añadiendo 20 μl de 100 mM CDNB. La reacción se midió 2 min a intervalos de 12 seg, integrando la pendiente observada.

IV. 2. 2. 5. Glioxalasa II (GIX-II, EC 3.1.2.6) (Regoli et al., 1997)

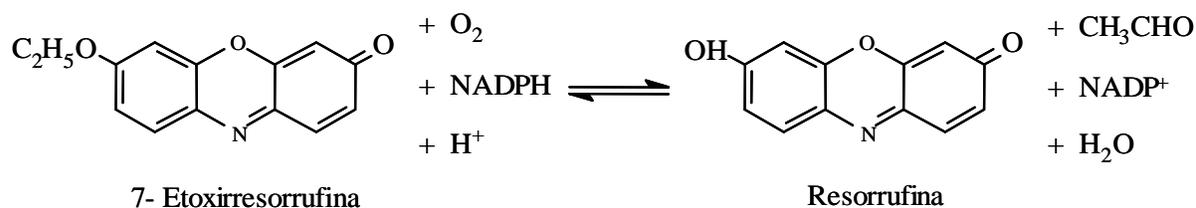
La actividad se ensayó espectrofotométricamente a 25° C, siguiendo el aumento de absorbancia a 412 nm ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), debido a reacción del ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) con el GSH liberado del S-D-lactoilglutación (LSG), en la reacción:



La mezcla de reacción contenía 0,1 M tampón Tris-HCl, pH 7,2, 0,9 mM S-D-lactoilglutación, 0,2 mM DTNB y 10 μl de extracto citosólico en un volumen final de 0,5 ml. La reacción se midió 2 min a intervalos de 12 seg y se integró la pendiente observada.

IV. 2. 2. 6. Etoxisresorrufina-O-desetilasa (EROD) (Fernandes et al., 2002)

El ensayo se basa en la desetilación de la 7-etoxiresorrufina según la reacción:



La actividad EROD se determinó fluorimétricamente (Perkin Elmer, modelo LS 50B) a 530 nm de λ de excitación y 585 nm de emisión. La mezcla de ensayo contenía 96 mM Tris-HCl, pH 7,8, 3,32 μM 7-etoxiresorrufina, y 20 μl de preparación microsomal, en 1 ml de

volumen final. La reacción se inició añadiendo 10 μl de 0,2 mM NADPH y se incubó 60 min a 30° C, pasado lo cual las muestras se metieron en hielo deteniendo la reacción. La actividad se midió como nanomoles de resorufina producidos en 3600 segundos. La cuantificación absoluta se realizó usando resorufina como patrón.

IV. 2. 2. 7. Determinación de malondialdehido (MDA) (de Almeida et al., 2004)

El MDA se midió por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detección fluorimétrica, tras el tratamiento con ácido tiobarbitúrico. Se añadió 20 μl de homogenado a una mezcla que contenía 142,5 μl de sacarosa 0,25mM, 25 μl de SDS al 10% y 62,5 μl de ácido tiobarbitúrico al 0,4% en NaOH 0,1 N. La mezcla se agitó y calentó 1 h a 100° C, tras enfriarse se añadió 250 μl de 1-butanol y se agitó bien. Luego, se centrifugó 5 min a 10000 \times rpm a Tª ambiente, para precipitar las proteínas, y se recogió el sobrenadante. Las muestras (20 μl) se inyectaron en una columna Supercosil LC-18 (0,46 \times 25 cm, partículas 5 μm ; Supelco, Bellefonte, PA, USA) acoplada a un aparato Beckman 126 (San Ramón, CA, USA), usando como fase móvil 50 mM NaH_2PO_4 / 40 % metanol, ajustada a pH 7 con H_3PO_4 , a un flujo de 1 ml/min. La fluorescencia se midió con un detector FP-2020 Plus (Jasco, MD, USA) a 515 nm de λ de excitación, y 550 nm de emisión. El área de los picos se analizó con el 32Karat™ Software, versión 7.0 (Beckman Coulter).

Para obtener una medida de MDA en términos absolutos se preparó una curva patrón a partir de concentraciones conocidas de tetrametoxipropano (TMP), que en las condiciones del ensayo proporciona cantidades equimolares de MDA.

IV. 2. 2. 8. Determinación de glutatión (GSH y GSSG) (Ruiz-Laguna et al., 2001)

El contenido de glutatión se determinó por HPLC con detección electroquímica. Para determinar las formas solubles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG), se utilizó un sistema de HPLC (Hewlett Packard 1100, Waldbronn, Alemania), con una columna de fase reversa Supelcosil LC-18 (0,46 \times 25 cm, partículas 5 μm ; Supelco, Bellefonte, PA, USA). La fase móvil fue 0.15 M fosfato sódico, pH 2.0, que contenía 1% metanol (GSH) ó 2 % metanol (GSSG) y el flujo isocrático de 1 ml/min. Se utilizó un detector electroquímico Coulochem II (ESA, Bedford, MA, EEUU) con una célula analítica 5010 y una guarda célula 5020 con los siguientes potenciales: para GSH, guarda célula 0.9 V, detector 0.8 V; para GSSG, guarda célula 1.1 V, detector 1.025 V. La escala completa fue de 50 μA para GSH y de 1 μA para GSSG. Las áreas de los picos se analizaron con el

software Beckman System Gold. El estado redox del glutatión se expresó como el cociente $2 \times \text{GSSG} / \text{GSH}$.

IV. 2. 2.9. Determinación de Metalotioneinas (MTs) (Alhama et al., 2006)

Las proteínas derivatizadas (20 μl) se separaron en una columna Supelcosil LC-18 (0.46 x 25 cm, 5 μm tamaño de partícula; Supelco, PA, USA). Los solventes fueron: A, 0,1% TFA en H_2O , y B, 0,1% TFA en acetonitrilo. Tras la inyección, la fase móvil se mantuvo 10 min a 0,7 A/0,3 B, cambiando a 0,3 A/0,7 B (gradiente lineal de 1 minuto). Luego se restablecieron las condiciones iniciales (0,7 A/0,3 B) empleando un gradiente lineal de 1 minuto. El flujo se mantuvo a 1 ml/min durante todo el análisis. Un detector de fluorescencia FP-2020 Plus (Jasco, MD, USA) monitorizó la fluorescencia de las moléculas marcadas con mBBR con excitación a 382 nm y emisión a 470 nm. El área de los picos eluidos se analizó con el Gold Nouveau Software, versión 1.7, Beckman Coulter.

IV. 3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (BRADFORD, 1976)

Se determinó por el método Bradford (1976) con seroalbúmina bovina como patrón.

V. ANÁLISIS PROTEÓMICO

Todos los pasos se llevaron a cabo a 4° C y con extremadas precauciones, usando guantes y trabajando en una campana de extracción para evitar la contaminación de las muestras con queratina humana. Además todo el material se limpiaba minuciosamente con agua y etanol antes de usarlo. Los reactivos usados eran de grado analítico y el agua miliQ. En el estudio de campo se hicieron 3 réplicas por zona y se utilizaron geles de 24cm, mientras en los experimentos de exposición se usaron geles de 18 cm y se hicieron 4 réplicas por cada condición.

V. 1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

Las muestras de branquias, tejido nervioso o músculo se pesaron y homogenizaron manualmente en tubos eppendorfs (1.5ml) con un pistón de plástico, en tampón 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.5 M sacarosa, 0.15 M KCl, 20 mM DTT a razón de 1 ml/g de tejido suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas que contenía AEBSF, EDTA, bestatina, E-64, leupeptina y aprotinina. Los homogenados se centrifugaron 15 min a 14000 x g para eliminar todos los restos subcelulares y restos no biológicos. El sobrenadante se

incubó con benzonasa 500 U/ml durante 30 minutos y se ultracentrifugó durante 1 h a 100000 x g. En el sobrenadante se determinó la concentración de proteína por tinción con azul de Coomassie de BioRad (Bradford, 1976), se distribuyó en alícuotas y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

V. 2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

El **isoelectroenfoque** (IEF) se llevó a cabo usando el sistema Bio-Rad IEF cell. La preparación de las muestras se realizó, mezclando 100 ó 150 µg de los extractos con tampón 7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 20mM DTT, 0.5% Pharmalyte 3-10, hasta 350 ó 450 µl para geles de IEF –Amershan Biosciences– de 18 ó 24 cm, respectivamente. Tras 30 min de reposo en este tampón desnaturizante, se centrifugaron a 14000 × g 10 min. Las muestras fueron aplicadas a la cámara de rehidratación, y encima de cada una se colocó, boca abajo, un gel de IEF de 18 o 24 cm y pH 4-7. Los geles fueron cubiertos con aceite mineral y se dejó al menos 6 h para una completa absorción de las proteínas y rehidratación pasiva de los geles, seguidamente se llevó a cabo el isoelectroenfoque a 20°C y 50 µA/tira siguiendo el siguiente programa: *fase 1*, 50 V, 2 mA, 5 W, 50 Vh, 6 h; *fase 2*, 500 V, 2 mA, 5 W, 1,5 h; *fase 3*, 1000 V, 2 mA, 5 W, 1,5 h; *fase 4*, 2000 V, 2 mA, 5 W, 1.5 h; *fase 5*, 4000 V, 2 mA, 5 W, 1.5 h; *fase 6*, 8000 V, 2 mA, 5 W, 2 h; *fase 7*, 8000 V, 2 mA, 5 W, 60000 Vh. Todo el proceso se realizó a 20° C (Fig. 20).

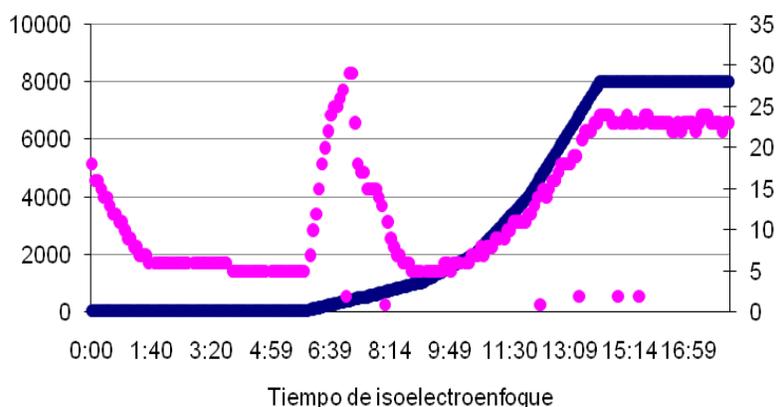


Fig. 20. Registro IEF. En azul el potencial en V (eje primario) y en rosa los µamperios (eje secundario)

La **segunda dimensión** de la electroforesis bidimensional (electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante SDS-PAGE) se llevó a cabo en el sistema PROTEAN Plus Dodeca cell (BioRad) para los geles de 18 y 24 cm. Todo el material fue lavado con agua

destilada y etanol antes de usarlo. Previamente a la electroforesis, los geles de IEF se equilibraron, 15 min, en 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6M urea, 30% glicerol, 2% SDS conteniendo 50 mM DTT, y a continuación otros 15 min en tampón de equilibrado conteniendo 250 mM yodoacetamida. Los geles de IEF equilibrados se colocaron luego sobre los geles de poliacrilamida al 12,5%, con un tira de papel Whatmann embebida en los marcadores de peso molecular, y fueron sellados con agarosa al 0,5%. La electroforesis de los geles de 18 y 24 cm se realizó con una intensidad de corriente de 35 mA/gel. El programa de electroforesis constó de dos pasos: 1) 2.5 W/gel 30 min, 2) 15 W/gel hasta el final (~5 horas). La temperatura, regulada por un baño, se mantuvo a 20° C durante el proceso.

V. 3. TINCIÓN DE GELES

El revelado de los geles bidimensionales se realizó por **tinción de plata**, los geles se fijaron en una solución que contenía 40% etanol y 10% ácido acético 30 min; a continuación, se incubaron en una solución de etanol, acetato sódico, y tiosulfato, durante ≥ 30 min. Posteriormente, se lavaron con agua destilada (3×5 min) y se añadió la solución de plata (2 g de AgNO_3 en 1L de agua), durante 20 min. A continuación, se incubaron 5 min con la solución de desarrollo (25 g de Na_2CO_3 y 400 μl de formaldehído en 1L de agua) y el revelado se detuvo una vez alcanzada una buena resolución de los spots de proteína añadiendo la solución de parada (14,6 g de EDTA- Na_2 en 1L de agua), 2×10 min. Los geles teñidos se lavaron con agua destilada, 3×5 minutos (Mortz et al., 2001).

V. 4. ANÁLISIS DE IMAGEN DE LOS GELES

Los geles se analizaron con el software PDQuest™ versión 7.1 (BioRad) que identificó las manchas (proteínas resueltas en 2-DE) cuyos cambios entre las 8 zonas estudiadas (o las 3 condiciones en experimentos de exposición) eran más significativas. Durante la tinción de plata, al no ser una tinción a punto final, la variación en la intensidad entre varios geles puede provocar falsos positivos. Para evitarlo, el software PDQuest permite normalizar el análisis; el parámetro de normalización basado en la densidad total de todas las manchas tomadas como válidas, corrige diferencias de intensidad de tinción entre geles. La normalización junto con un análisis estadístico preciso (solo se aceptaron diferencias significativas con $p \leq 0.001$), certifica que las diferencias encontradas se

debían a factores intrínsecos de las muestras y no a errores durante el experimento y análisis.

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los biomarcadores analizados se representan por las medias \pm error estadístico de 8 extractos independientes (8 individuos por separado) y 3 ensayos para cada extracto, salvo que se indique lo contrario. La significación estadística de los resultados se ensayó por el test Dunnett o el test Bonferroni según se indica en cada caso, usando el software InStat™ (Graphpad, San Diego, CA, USA). Previamente, se comprobó la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianza. La significación estadística se indica: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

La significación estadística de los resultados proteómicos fue determinada por el test de Student. Solo aquellas manchas con significación estadística $p < 0,001$ y con diferencia de intensidad, entre las áreas o condiciones de estudio, de $\geq 3m$ veces fueron seleccionadas como manchas de expresión alteradas. La normalidad de los datos y la homogeneidad de varianza fue comprobada previamente.

Resultados

I. ESTERASAS COMO BIOMARCADORES DE PLAGUICIDAS EN *P. CLARKII*: DISTRIBUCIÓN TISULAR, SENSIBILIDAD A PLAGUICIDAS MODELO Y REACTIVACIÓN ENZIMÁTICA

I.1 OPTIMIZACIÓN DE LOS ENSAYOS Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA IN DIFERENTES TEJIDOS

Las actividades AChE, BChE y CbE fueron analizadas en glándula digestiva, músculo y tejido nervioso de *P. clarkii* (Tabla 8). El uso de diferentes sustratos (acetil-, butiril-tiocolina y fenil-tioacetato) e inhibidores (PMSF e iso-OMPA) confirmó que las actividades AChE y CbE son muy elevadas en tejido nervioso, mientras la BchE es inapreciable. En glándula digestiva, la CbE fue la más abundante, seguida a gran distancia por BchE y AChE, que fue muy baja. En músculo las tres esterasas tuvieron niveles bajísimos. Ante estos resultados, las actividades y tejidos elegidos para la medida de esterasas como biomarcadores sensibles a OPs y CMs en *P. clarkii* fueron la AChE en tejido nervioso y la CbE en glándula digestiva.

Tabla 8. *Actividades específicas de la AChE, BChE y CbE en diferentes tejidos de P. clarkii*

Organo/Tejido	Actividades específicas (U/mg proteína)		
	AChE	CbE	BChE
Tejido Nervioso	1.796 ± 0.092 ^a	1.915 ± 0.016	0.044 ± 0.0040
Glándula Digestiva	0.030 ± 0.002	8.489 ± 0.147	0.082 ± 0.0002
Músculo	0.020 ± 0.005	0.045 ± 0.004	0.009 ± 0.0004

^a Los resultados muestran la media ± el error estandar

La determinación de los rangos lineares de los ensayo de AChE, BChE y CbE en diferentes tejidos se llevó a cabo añadiendo a cada ensayo volúmenes crecientes de extracto. La AchE fue lineal hasta 10µl de extracto de tejido nervioso y hasta 100µl en glándula digestiva y músculo, siempre con coeficientes de regresión ≥ 0.9 . La BchE fue lineal hasta 60µl de extracto de glándula digestiva, mientras en tejido nervioso y músculo fue inapreciable incluso con volúmenes de extracto muy grandes. Por último, la CbE fue lineal hasta 20µl de extracto de glándula digestiva, hasta 50µl en tejido nervioso y hasta 100µl en músculo (Fig.21 a-c). El volumen elegido para los ensayos rutinarios de AChE, en tejido nervioso, y de BChE y CbE, en hepatopáncreas, fue 2, 10 y 0.25 µl, respectivamente. Concentraciones de sustrato crecientes, hasta 50mM de ASCh y BSCh y 10 mM de PhSCh evidenciaron cinéticas tipo Michaelis-Menten para todas las actividades. Los valores de K_m , calculados por el método de Lineweaver-Burk, fueron 0.34 mM para la AChE en tejido nervioso y 6.25 y 0.83 mM para la BChE y CbE en glándula digestiva, respectivamente (Fig. 21 a'-c'). No se observó inhibición por sustrato para la AChE, incluso a 50mM de ASCh, en *P.clarkii*.

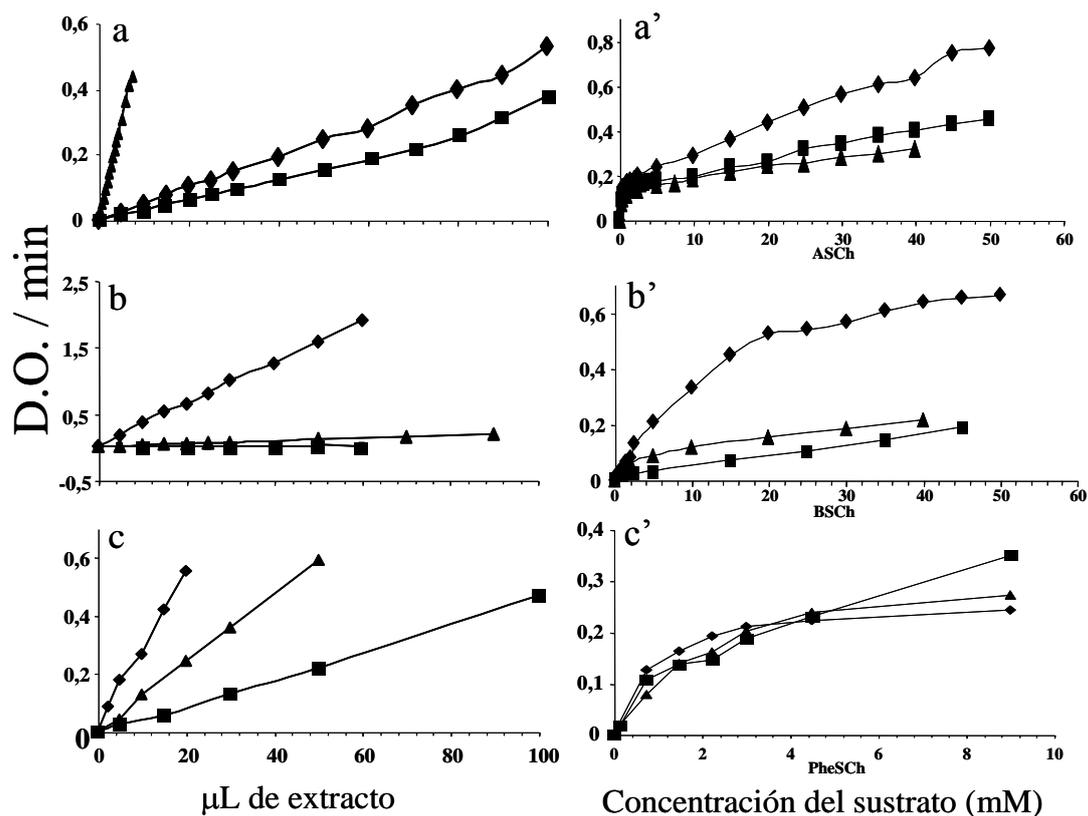


Fig. 21. *Caracterización de las actividades AChE (a,a'), BChE (b,b'), y CbE (c,c'), en tejido nervioso ▲, hepatopáncreas ◆ y músculo ■ de P. clarkii.* Relación entre volumen de muestra y actividad enzimática (a-c). Relación entre concentración de sustrato (acetilScolina, butirilScolina o fenilSacetato) y actividad enzimática (a'-c').

Tras la caracterización de la AChE, BChE y CbE en *P. clarkii*, se establecieron las condiciones de ensayo para su medida rutinaria (Tabla 9). La AChE se midió en tejido nervioso y BChE y CbE en glándula digestiva. En los ensayos AChE y BChE y CbE se utilizó 10, 10 y 4.5 mM de sustrato, y 2, 40 y 0.25 μ l de extracto, respectivamente.

Tabla 9. *Volumen y dilución de muestra* establecidos para los ensayos de actividad AChE, BChE y CbE en diferentes tejidos de *P. clarkii*

Organo/Tejido	AChE		CbE		BChE	
	Volumen (μ l)	Diluc.	Volumen (μ l)	Diluc.	Volumen(μ l)	Diluc.
Tejido Nervioso	2	1:1	10	1:10	10	1:1
Glándula Digestiva	50	1:1	5	1:20	40	1:1
Músculo	50	1:1	30	1:1	80	1:1

I.2. EFECTO DEL TRITON X 100 EN LA SOLUBILIZACIÓN Y ENSAYO DE ESTERASAS

Para evaluar la existencia de formas unidas a membrana, se extrajeron las actividades AChE, BChE y CbE de glándula digestiva, músculo y tejido nervioso con y sin Tritón X-100, un detergente no iónico (Tabla 10). En glándula digestiva y músculo se extrajeron niveles similares de actividad en ausencia y presencia de detergente, indicando que todas las esterasas eran citosólicas. Sin embargo, el tejido nervioso extraído con Triton X 100 tuvo ~3veces más actividad que los extractos sin detergente. Estos resultados indican la conveniencia de usar detergentes en el tampón de extracción para solubilizar las formas unidas a membrana, al menos en tejido nervioso. No obstante, el efecto del Triton X 100 sobre las esterasas fue evaluado previamente para medir posibles interferencias de este detergente en cada uno de los ensayos.

Tabla 10. *Extracción de AChE, BChE y CbE en diferentes tejidos con y sin Triton X-100*

Órgano/Tejido	Triton X-100	Actividades específicas (U/mg proteína)		
		AChE	CbE	BChE
Tejido Nervioso	–	1.796 ± 0.092 ^a	1.915 ± 0.016	0.044 ± 0,0040
	+	6.702 ± 0.691	6.054 ± 0.284	0.125 ± 0.0140
Glándula Digestiva	–	0.030 ± 0.002	8.489 ± 0.147	0.082 ± 0.0002
	+	0,049 ± 0.007	8.963 ± 0.487	0.093 ± 0.0150
Muscle	–	0.020 ± 0.005	0.045 ± 0.004	0.009 ± 0.0004
	+	0.040 ± 0.003	0.059 ± 0.007	0.008 ± 0.0010

^aLos resultados muestran la media ± el error estandar

Con este fin, se prepararon extractos de glándula digestiva (para ensayar BChE y CbE) y tejido nervioso (para medir AChE) en ausencia de detergente, y se ensayaron las actividades en su ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de Tritón X-100 (Fig. 22). El detergente estimuló claramente la AChE por encima de 0.01%, mientras las BChE y CbE se inhibieron visiblemente a medida que aumentaban las concentraciones de detergente. La AChE aumentó 1.5 veces con 0.1, 1 y 2 % de detergente y tuvo niveles cercanos al control con 5 % Triton. Por el contrario, la BChE se inhibió a la mitad a 0.1, 1 y 2 % de detergente y más de 2/3 con 5 % triton. La CbE fue la menos sensible, permaneció inalterable a 1% de detergente, aunque perdió un 5% de su actividad a 2% Triton. El efecto de este detergente en las

actividades esterasas nos llevó a excluir su uso en la preparación de las muestras, usando extractos citosólicos para la medida de esterasas en ensayos sucesivos.

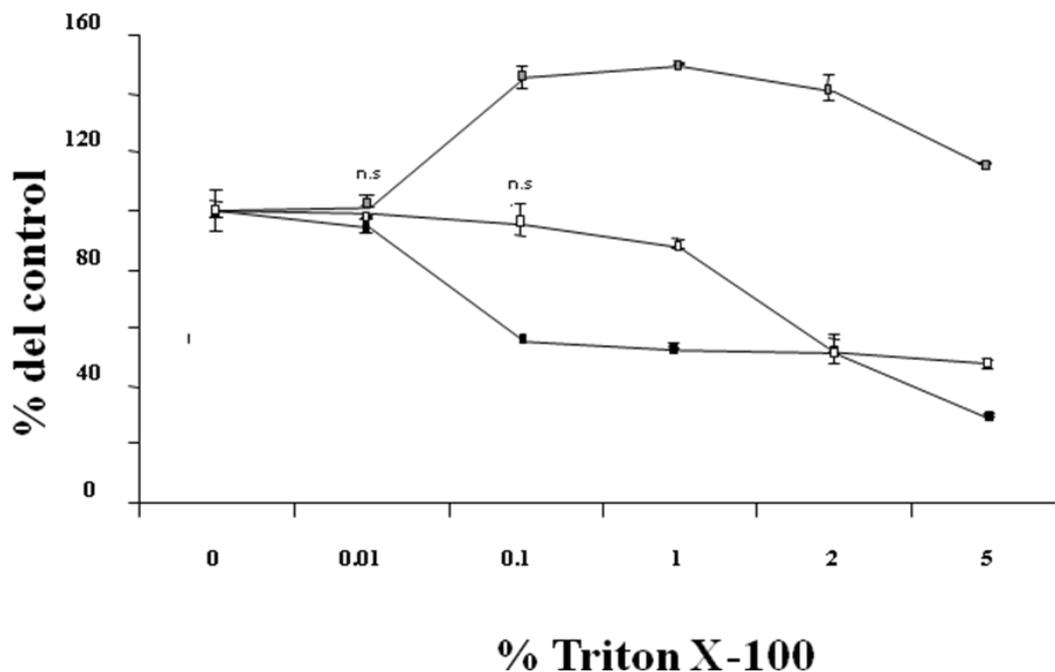


Fig. 22. *Efecto de la concentración de Tritón X-100* en los ensayos de AChE (■), BChE (■) y CbE (□). Las actividades se muestran como porcentaje de cada actividad en el control sin detergente añadido. Su significación se estudió por ANOVA mediante el test Dunnett ($N=3$) frente al control. Salvo cuando se marca n.s., las diferencias fueron significativas con $p<0.01$.

I.3 SENSIBILIDAD DE LAS ESTERASAS A PMSF E ISO-OMPA EN *P. CLARKII*

El PMSF inhibió las actividades esterasas en distinto grado: la AChE (Fig. 23.2) y sobre todo la BChE (Fig. 23.1) resultaron muy sensibles en todos los tejidos, mientras la CbE (Fig. 23.3) tuvo diferente sensibilidad dependiendo del tejido, siendo completamente inhibida por 2mM PMSF en glándula digestiva, pero inhibiéndose solo hasta el 70% de la actividad del control en tejido nervioso, incluso a 10 mM. A diferencia de la elevada susceptibilidad a PMSF, las actividades esterasas mostraron distinta sensibilidad a iso-OMPA. Este inhibidor afectó a todas las esterasas en glándula digestiva: BchE fue totalmente inhibida a baja concentración (0.2 mM), pero eran necesarias altas concentraciones de iso-OMPA para conseguir una inhibición similar en las actividades CbE (0.5 mM) y AChE (2 mM), que fue la menos sensible (Fig. 23.1'-3'). No obstante, tanto en músculo como en tejido nervioso, órganos que poseían escasa actividad BChE, el iso-OMPA inhibió las esterasas solo parcialmente, del orden del 10-40% de su actividad inicial.

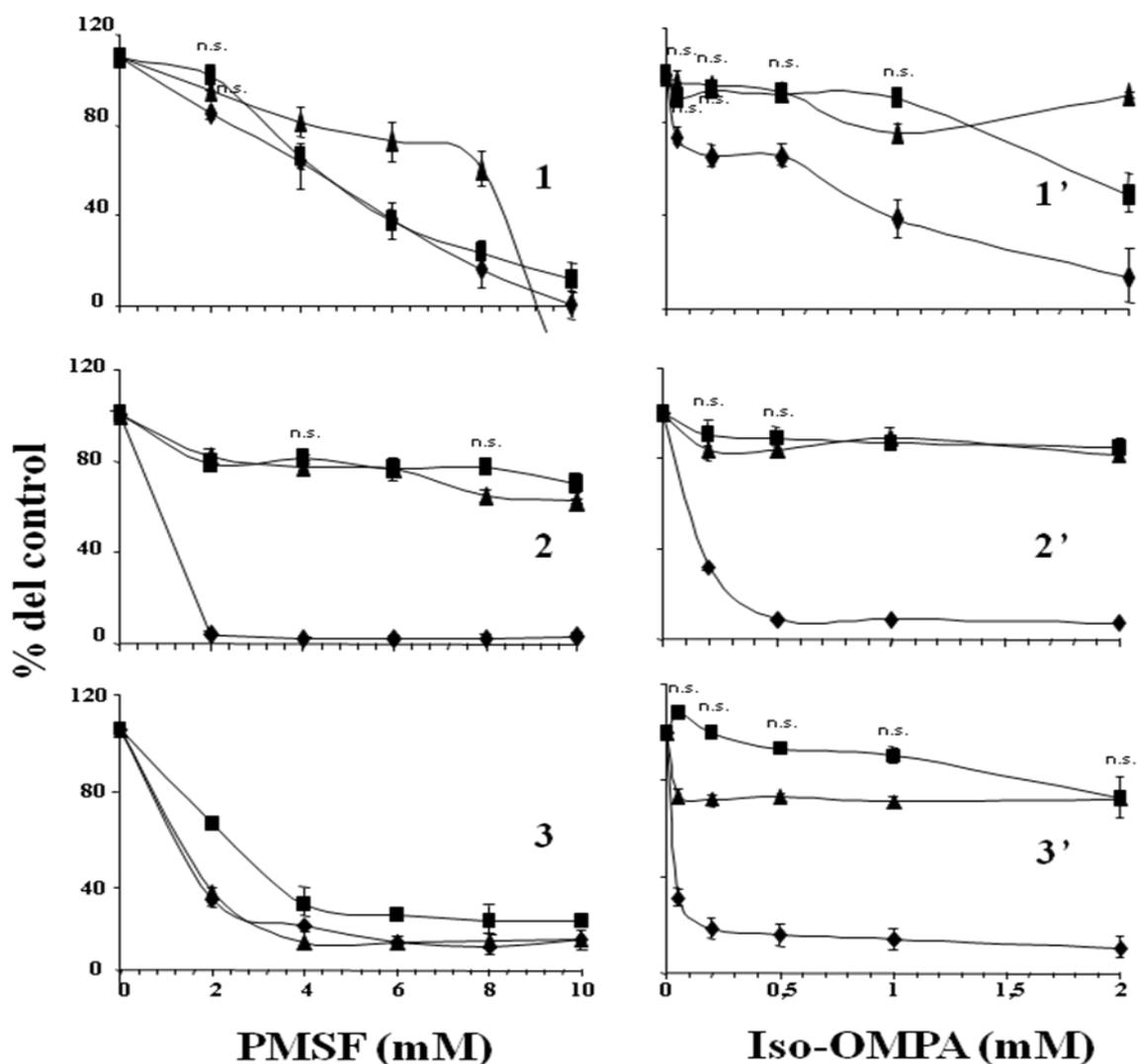


Fig. 23. Efecto de PMSF e iso-OMPA sobre AChE (1,1'), CbE (2,2') y BChE (3,3') de gl. digestiva (◆), tejido nervioso (▲) y muscular (■). Las actividades se muestran como porcentaje del control sin adición. Su significación se estudió por ANOVA con el test Dunnett ($N=3$) frente al control. Excepto si se marca n.s., las diferencias fueron significativas con al menos $p < 0.05$.

I.4. SENSIBILIDAD DE LAS ESTERASAS DE *P. CLARKII* A PLAGUICIDAS MODELO OPS Y CMS

Para medir la sensibilidad de *P. clarkii* a OPs y CMs, se ensayó AChE en t. nervioso y CbE y BChE en glándula digestiva, donde eran predominantes. Primero estudiamos la inhibición de la AChE en extractos de tejido nervioso incubados con clorpirifos, carbaril, malatión y eserina (Fig. 24). Todos estos plaguicidas inhibieron la AChE, pero los carbamatos precisaron menos tiempos de incubación, 10 minutos, que los OPs, 20 minutos, para inhibirla totalmente. Por ello, se seleccionaron 10 y 25 minutos de incubación para obtener una completa inactivación de las esterasas de *P. clarkii* por CMs y OPS.

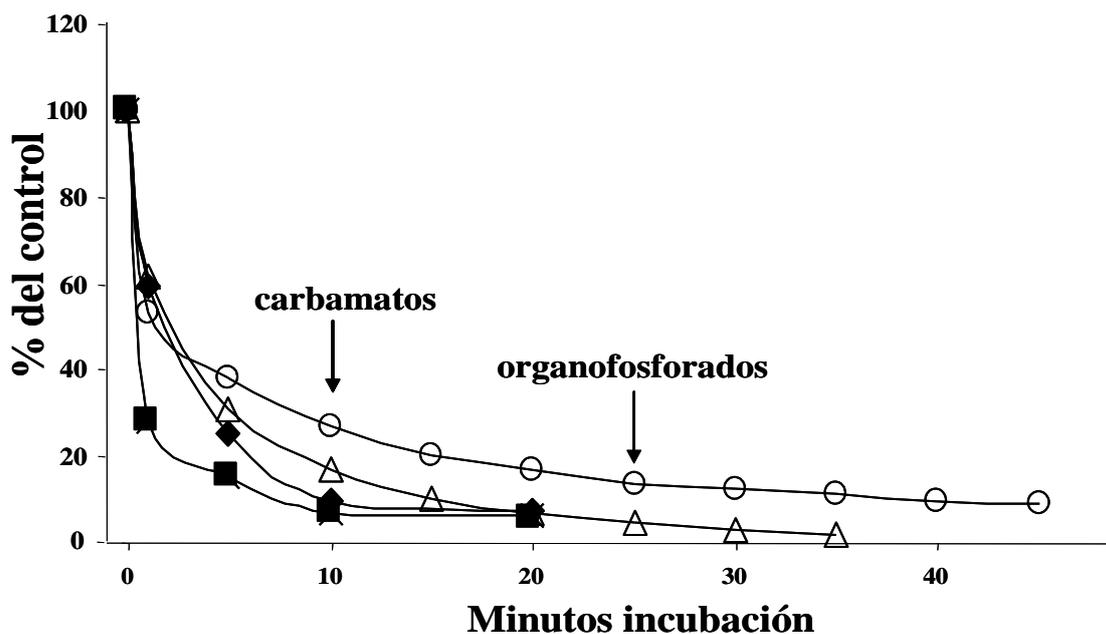


Fig. 24. *Evolución de la AChE de tejido nervioso expuesto a plaguicidas* OPs [2×10^2 M clorpirifos (Δ), 5×10^2 M malatión (\circ)] o CMs [10^5 M carbaril (\blacksquare) o eserina (\blacklozenge)]. Las actividades se muestran como porcentaje del control sin adición. Su significación se estudió por ANOVA con el test Dunnett ($N=3$) frente al control, $p < 0.01$.

Seguidamente procedimos a estudiar el efecto de diferentes concentraciones de clorpirifos y malatión (plaguicidas OPs) o carbaril y eserina (plaguicidas CMs) sobre las diferentes actividades esterasas (Fig. 25). Para ello se midieron las actividades AChE, BChE y CbE en extractos citosólicos de glándula digestiva y tejido nervioso incubados con plaguicidas durante 10 o 25 min. Mientras una concentración de 10^{-5} M de eserina o carbaril bastaba para inactivar completamente la actividad AChE, fue necesario alcanzar concentraciones 10^{-2} M de malatión o 10^{-3} M de clorpirifos para conseguir la inhibición completa de esta actividad. La actividad BChE fue la menos sensible, pues aunque era completamente inhibida por 2×10^{-2} M de malatión o clorpirifos no se inhibía completamente por ninguno de los CMs en presencia de concentraciones comprendidas entre 10^{-9} M y 10^{-3} M de ambos plaguicidas. La actividad CbE tuvo diferente sensibilidad frente a cada plaguicida estudiado: fue totalmente inhibida por 10^{-4} M de clorpirifos o carbaril, pero se inhibió sólo hasta un 30% de su actividad inicial incluso en presencia de altas concentraciones de malatión o eserina.

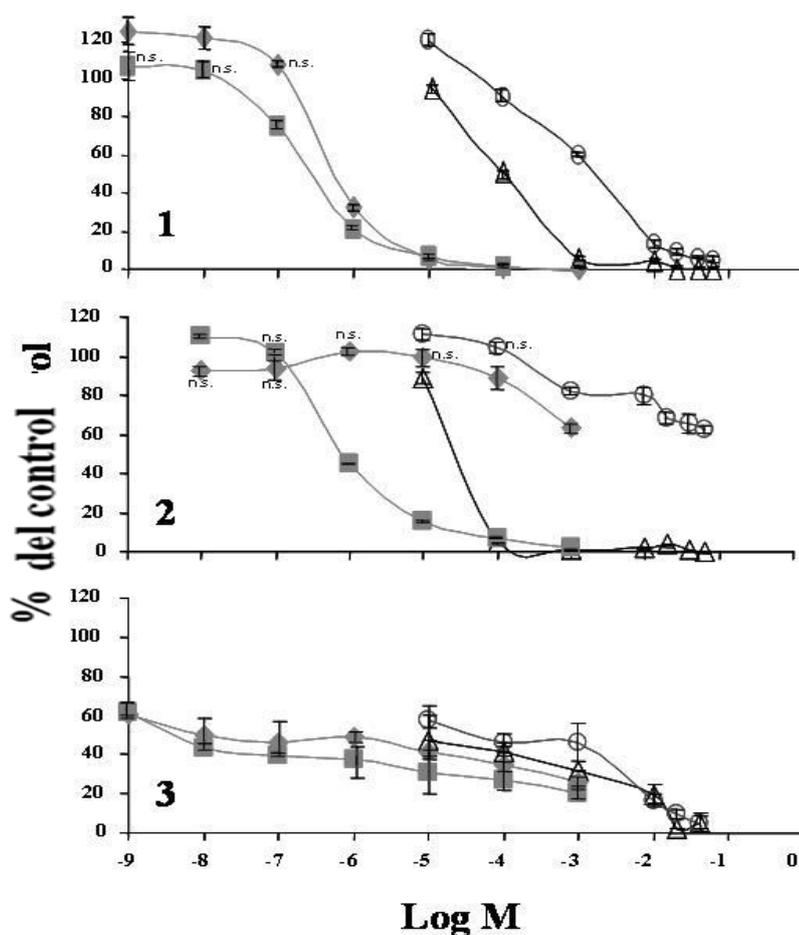


Fig. 25. *Sensibilidad de AChE (1), CbE (2) y BChE (3) a OPs [clorpirifos (Δ), malation (O)] o CMs [carbaril (■), eserina (◆)]. Las actividades se muestran como porcentaje del control sin adición. Su significación fue estudiada por ANOVA Dunnett test ($N=3$) comparado con el control. Excepto cuando se marca n.s., las diferencias fueron significativas con $p<0.01$.*

La Tabla 11 muestra las IC_{50} (concentración que inhibe al 50 %) de los plaguicidas. Siempre había un control con el disolvente adecuado durante la incubación para determinar la hidrólisis espontánea y otro sin inhibidor para comprobar la estabilidad del extracto. En general, las esterasas fueron más sensibles a CMs que a OPs, que inhibieron a concentraciones entre 10^{-4} y 10^{-3} M, salvo la CbE insensible a eserina y malatión, aunque ésta actividad fue la más sensible a clorpirifos.

Tabla 11. *Valores IC_{50} calculados para cada plaguicida sobre las esterasas de *P. clarkii**

	AChE	BChE	CbE
Malatión (M)	2×10^{-3} M	10^{-3} M	Nd
Clopirifos (M)	10^{-4} M	10^{-3} M	3×10^{-5} M
Carbaril (M)	3×10^{-7} M	nd	7×10^{-7} M
Eserina (M)	7×10^{-7} M	nd	Nd

nd: no determinado

I.5. REACTIVACIÓN DE AChE Y CbE TRAS INHIBICIÓN CON PLAGICIDAS OPS Y CMS.

Seguidamente estudiamos la reactivación de las actividades AChE (Fig. 26), en t. nervioso, y CbE, en glándula digestiva, totalmente inactivadas por clorpirifos y carbaril. Se examinó el tiempo necesario para recobrar la actividad, tras añadir diferentes concentraciones de 2-PAM, diluir el extracto inhibido (1/30 y 1/60) y tras 1 o 2 pasos de ultrafiltración, para desarrollar una metodología que permitiera distinguir entre una exposición a plaguicidas OPs o CMs en *P. clarkii*.

Los extractos sin plaguicida mantuvieron su actividad inicial tras ultracentrifugar y diluir 1/30 o tratar con 2-PAM y diluir 1/30. En cambio, cuando se trató con clorpirifos (OP) la AChE permaneció inactiva tras eliminar el plaguicida y no se reactivó tras 4 horas con dilución 1/30. Las muestras tratadas con OP recobraron 50% de la actividad AChE inicial inmediatamente tras tratar con 2-PAM. Las enzimas tratadas con carbaril recobraron su actividad tras eliminar el CM, en un proceso dependiente del tiempo que ocupó 2 horas para recobrar un 50% de su actividad inicial. La presencia simultánea de 2-PAM no produjo ningún efecto adicional.

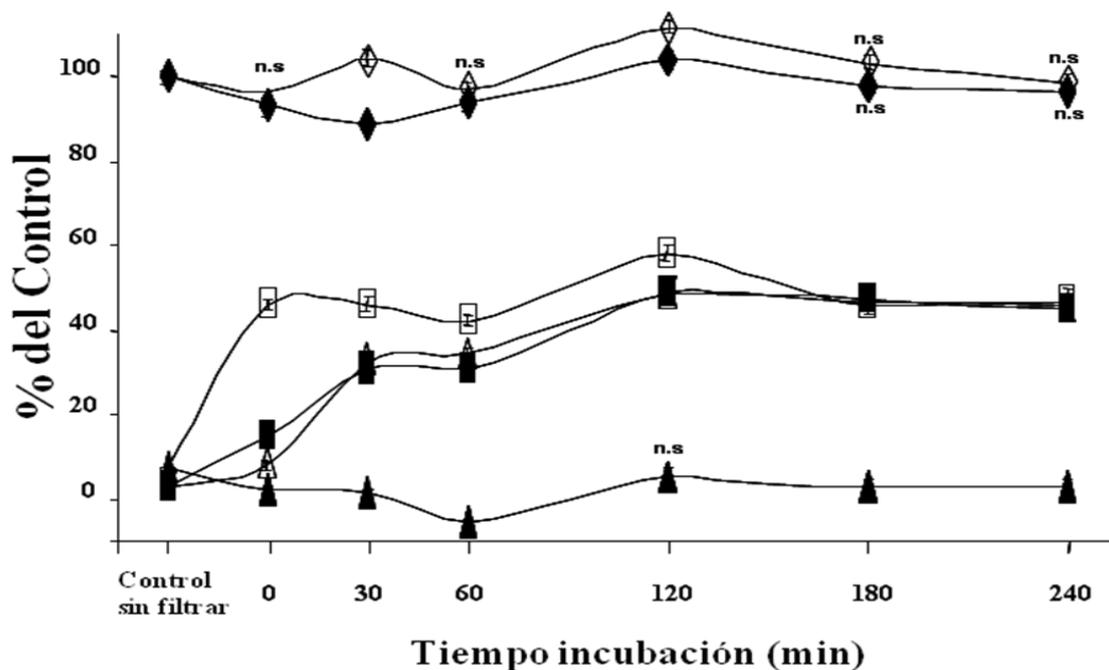


Fig. 26. *Reactivación de AChE inhibida por clorpirifos y carbaril.* AChE de t. nervioso se incubó sin plaguicida (◆) o con 10^{-2} M clorpirifos (▲) 25 min. a 25°C o con 10^{-4} M carbaril (■) 10 min. a 25°C . Tras su completa inactivación, las mezclas se diluyeron 1/30 sin (◆,▲,■) o con 0.5×10^{-4} M 2-PAM (◇,△,□) 4 h. La actividad AChE se ensayó a los tiempos indicados. Las actividades se muestran como porcentaje del control sin plaguicida. Su significación se estudió por ANOVA con el ensayo Dunnett ($N=3$) frente al control no filtrado. Excepto cuando se marca n.s., las diferencias fueron significativas con al menos $p < 0.05$.

Para optimizar la reactivación de la AChE probamos nuevas condiciones experimentales para eliminar mejor el plaguicida libre (Tabla 12). La AChE, totalmente inhibida por carbaril, se reactivó al 35% por dilución 1/30 seguida de 1 filtrado y al 69% por dilución 1/30 seguida de 2 filtrados, siendo significativas las diferencias entre ambos; en general, la adición de 2-PAM no mejoró significativamente la reactivación de la enzima tratada con el CM. Por el contrario, ni la filtración ni la dilución reactivaron la AChE tratada con clorpirifos (OP), solo el 2-PAM la reactivó alrededor del 30%, observándose un efecto significativo de la filtración en ambas diluciones.

Tabla 12. *Reactivación de la AChE inhibida por clorpirifos o carbaril.* La AChE (t. nervioso) inactivada por 10^{-2} M clorpirifos o 10^{-4} M carbaril fue diluida sin o con 5×10^{-4} M 2-PAM, analizando el efecto de la dilución 1/30 o 1/60 tras 1o 2 filtrados. La significación estadística se estudió por ANOVA con el test Bonferroni (N=3) y se muestra como: a) 1 filtrado, dilución 30 vs 60 ($p < 0.01$, al menos), b) dilución 30, 1 vs 2 filtrados ($p < 0.01$, al menos), c) dilución 60, 1 vs 2 filtrados ($p < 0.001$), d) 2 filtrados, dilución 30 vs 60 ($p < 0.05$, al menos)

	1 filtrado		2 filtrados	
	dilución 30	dilución 60	dilución 30	dilución 60
Control	100.7 ± 19.5	101.8 ± 3.2	99.6 ± 2.8	100.0 ± 2.6
Control + 2PAM	104.0 ± 9.2	102.8 ± 2.2 ^c	109.2 ± 7.2	114.9 ± 4.7 ^c
Carbaril + dilución	35.3 ± 0.8 ^{a,b}	46.6 ± 2.4 ^{a,c}	68.7 ± 7.3 ^{b,d}	56.1 ± 7.9 ^{c,d}
Carbaril + dilución + 2PAM	35.6 ± 1.7 ^{a,b}	50.8 ± 1.9 ^{a,c}	70.1 ± 4.5 ^b	77.4 ± 2.8 ^c
Clorpirifos + dilución	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Clorpirifos + dilución + 2PAM	34.8 ± 3.8 ^b	32.4 ± 1.2 ^c	49.7 ± 12.5 ^{b,d}	41.0 ± 4.4 ^{c,d}

La reactivación de la actividad CbE, inhibida por carbaril o clorpirifos, se estudió de forma similar al experimento antes descrito para la AChE (Tabla 13). En este caso, las concentraciones de plaguicidas usadas fueron menores, 5×10^{-5} M de carbaril y 5×10^{-4} M de clorpirifos, aumentando algo la concentración de 2-PAM (10^{-3} M) y usando dilución 1/50 en vez de 1/60. Al igual que para la AChE, la reactivación de la actividad CbE fue instantánea para los extractos inhibidos con OP y tratados con oxima y tardó 120 minutos para los extractos inhibidos con CM y reactivados por dilución. Tras 2 filtraciones la reactivación de la CbE tratada con carbaril aumentó hasta un 50%; el tratamiento con 2-PAM, el número de filtraciones y el grado de dilución tuvieron un efecto aditivo, consiguiendo un 67% de reactivación tras 2 filtraciones y una dilución 1/50 en presencia de 2-PAM. La CbE inhibida por clorpirifos no se reactivó más del 8% tras eliminar el exceso de OP, tras 1 y 2 filtraciones. El tratamiento de la CbE con 2-PAM fue menos efectivo que en el caso de la AChE, pues solo se recuperó un 21% de la actividad CbE tras 2 filtrados y dilución 1/50.

Tabla 13. *Reactivación de la CbE inhibida por clorpirifos o carbaril.* CbE (glándula digestiva) inactivada por 5×10^{-4} M clorpirifos o 5×10^{-5} M carbaril fue diluida (50 veces) sin o con 10^{-3} M 2-PAM. El efecto de la dilución 1/30 o 1/50 tras 1 o 2 filtraciones fue estudiado. La significación estadística fue estudiada por ANOVA Bonferroni test (N=3) y se muestra como:: a) 1 filtrado, dilución 30 vs 50 ($p < 0.01$, al menos), b) dilución 30, 1 vs 2 filtrados ($p < 0.01$, al menos), c) dilución 50, 1 vs 2 filtrados ($p < 0.01$), d) 2 filtrados, dilución 30 vs 50 ($p < 0.001$)

	1 filtrado		2 filtrados	
	dilución 30	dilución 50	dilución 30	dilución 50
Control	100 ± 5.0^a	93.7 ± 6.0^a	100.0 ± 4.2	97.4 ± 2.5
Control + 2PAM	108.6 ± 3.3	106.6 ± 5.3	104.6 ± 12.4	105.0 ± 6.45
Carbaril + dilución	$20.6 \pm 1.5_{a,b}$	$26.8 \pm 2.0^{a,c}$	$30.0 \pm 0.9^{b,d}$	$50.4 \pm 1.2_{c,d}$
Carbaril + dilución + 2PAM	$26.6 \pm 1.9_{a,b}$	$36.5 \pm 5.0^{a,c}$	$35.3 \pm 1.2^{b,d}$	$66.6 \pm 5.5_{c,d}$
Clorpirifos + dilución	5.0 ± 0.2	2.6 ± 0.5	7.8 ± 1.0	3.7 ± 0.4
Clorpirifos + dilución + 2PAM	11.2 ± 1.4	11.5 ± 0.1^c	13.8 ± 3.2	20.6 ± 3.9^c

Los experimentos de reactivación *in vitro* de extractos tratados con plaguicidas resumidos arriba mostraban que la reactivación de las actividades AChE y CbE por tratamiento con 2-PAM ó por dilución del extracto previamente inhibido podía ser un buen método para diferenciar entre la exposición a plaguicidas OPs ó CMs. En efecto, mientras la actividad de las esterasas inhibidas por CMs se recupera con la simple dilución de los extractos, las actividades inhibidas por OPs sólo se recuperan tratando los extractos con coximas, como 2-PAM.

Para verificar si estas diferencias se mantenían en animales expuestos *in vivo*, se diseñaron sendos experimentos de exposición a clorpirifos y carbaril, en los cuales se analizaron las actividades AChE y CbE y se intentó su reactivación por dilución ó tratamiento con 2-PAM. Esta misma metodología se siguió también con las muestras procedentes del PND y su entorno durante las cuatro campañas de muestreo que se llevaron a cabo en este trabajo. Los resultados no nos permitieron evaluar a qué clase de plaguicida fueron expuestos los cangrejos durante el experimento ni en las áreas potencialmente contaminadas del Parque.

II. PUESTA A PUNTO DE OTROS BIOMARCADORES EN *P. CLARKII*

II.1 ENZIMAS ANTIOXIDATIVAS Y DESTOXIFICADORAS

En extracto citosólico de glándula digestiva de *P. clarkii* se pusieron a punto los ensayos de ocho enzimas ya validadas como biomarcadores de contaminación en otras especies, aunque no se detectó actividad de otras 2, glutatión reductasa y glioxalasa I. Se estableció su naturaleza enzimática y linealidad y las concentraciones de saturación de los sustratos. Finalmente, se indican las condiciones óptimas de cada ensayo para su uso como biomarcador en *P. clarkii*.

Catalasa (CAT). Se partió del protocolo de Beers y Sizer (1952). La Tabla 14 muestra que el descenso de H₂O₂ no ocurre en muestras hervidas o tratadas con cianuro. La actividad CAT no presenta saturación por sustrato, aumentando incluso a 60 mM H₂O₂.

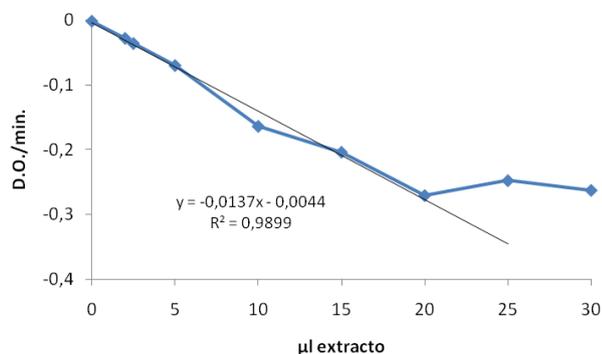
Tabla 14. Caracterización del ensayo de la Catalasa en *P.clarkii*.

Sistema ^a	$\Delta A_{240}/\text{min}$
Completo	-0.213
Sin H ₂ O ₂	0.004
20 mM H₂O₂	-0.287
40 mM H ₂ O ₂	-0.307
60 mM H ₂ O ₂	-0.446
Completo + NaCN	0.002
Completo, extracto hervido	-0.001

^a-se ensayaron 10ul de extracto de glándula digestiva diluido 5 veces en tampón de extracción.

La Fig. 27 muestra la actividad CAT frente al volumen de extracto ensayado. El ensayo fue lineal entre 2-20 μl . En los ensayos rutinarios se usaron 20mM de H₂O₂ y 20 μl de muestra diluida 1:5.

Fig. 27. Actividad CAT. Efecto del volumen de extracto en al descenso de A₂₄₀ La correlación se indica como R².



Superóxido Dismutasa (SOD). Se partió del protocolo de Flohé y Günzler (1984). La mezcla de reacción contenía 19,2 μM citocromo c, 48 μM xantina y 0,2 U de xantina oxidasa. Como muestra la Tabla 15, la ausencia de actividad en la muestra hervida refleja la naturaleza enzimática del ensayo de la SOD.

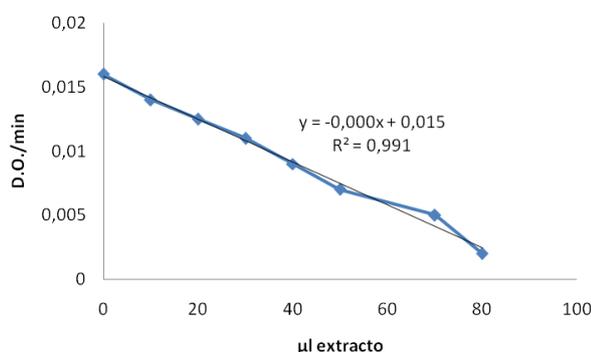
Tabla 15. Caracterización del ensayo de la SOD en extractos crudos de *P. clarkii*.

Sistema ^a	$\Delta A_{550}/\text{min}$
Completo	1.044
Completo, extracto hervido	0.00

^a.-se ensayaron 20 μl de extracto de glándula digestiva de *P. clarkii*.

La actividad SOD (descenso de A_{550}/min) fue lineal hasta 80 μl de extracto de glándula digestiva ensayados (Fig. 28). En los ensayos rutinarios se usaron y **20** μl de muestra.

Fig. 28. Actividad SOD. Efecto del volúmen de extracto en el descenso de A_{550} . La correlación se indica como R^2 .



Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Se partió del protocolo de Löhr y Waller (1974). Como muestra la Tabla 13, la actividad depende de las concentraciones de NADP^+ y glucosa-6P. Se consideran saturantes 0.45 mM y 0.6 mM respectivamente, pues el doble de concentración de ambos sustratos no aumenta la actividad. El extracto de glándula digestiva hervido 10 minutos, no tuvo actividad indicando la naturaleza enzimática del ensayo.

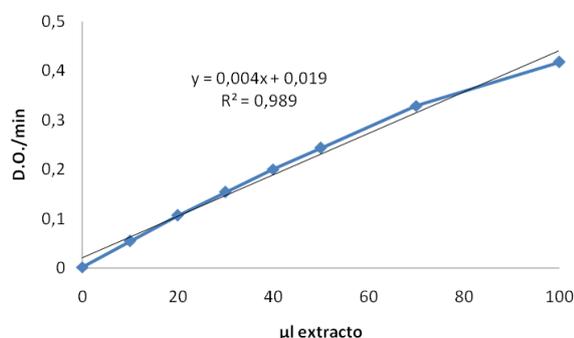
Tabla 16. Caracterización del ensayo de la G6PDH en g. digestiva de *P. clarkii*

Sistema ^a	$\Delta A_{340}/\text{min}$
Completo	0.222
Sin glucosa 6P (excepto la del extracto)	0.064
0.6 mM glucosa 6P	0.222
1.2 mM glucosa 6P	0.232
Sin NADP^+	0.001
0.45 mM NADP^+	0.240
0.9 mM NADP^+	0.233
Completo, extracto hervido	-0.001

^a.-se ensayaron 50 μl de extracto sin diluir.

La Fig. 29 muestra la actividad G6PDH en función del volumen de extracto ensayado. El ensayo resultó lineal hasta 100ul de muestra, con un coeficiente de regresión lineal de 0.999. Por tanto, se emplearon **50** ul de extracto de glándula digestiva en los ensayos rutinarios de G6PDH.

Fig. 29. *Actividad G6PDH.* Efecto del volumen de extracto en el aumento de $\Delta A_{340}/\text{min}$. La correlación se indica como R^2 .



6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH). A partir del protocolo de Löhr y Waller (1974), comprobamos la dependencia de la 6-PGDH de las concentraciones de NADP⁺ y P-gluconato y su ausencia al hervir el extracto (Tabla 17). Como concentraciones saturantes se establecieron 0.5mM de NADP⁺ y 2mM de P-gluconato, pues al doblarlas se obtuvo idéntica actividad. Por ello, estas concentraciones fueron las usadas en los ensayos rutinarios.

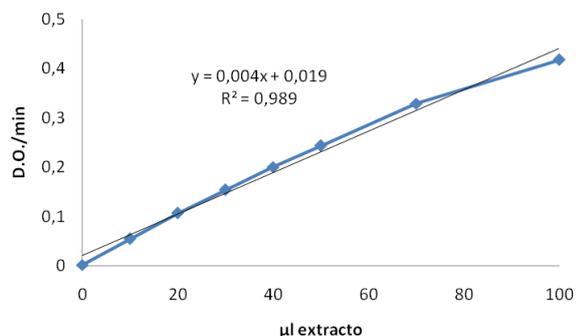
Tabla 17. *Caracterización del ensayo de la 6-PGDH en g. digestiva de P.clarkii.*

Sistema ^a	$\Delta A_{340}/\text{min}$
Completo	0.243
Sin P-guconato	0.084
2 mM P-gluconato	0.249
4 mM P-guconato	0.252
Sin NADP ⁺	0.002
0.5 mM NADP⁺	0.247
1 mM NADP ⁺	0.253
Completo, extracto hervido	0.002

^a.-se ensayaron 50ul de extracto de glándula digestiva sin diluir.

La actividad 6-PGDH en función del volumen de extracto se muestra en la Fig. 30. El ensayo fue lineal hasta 100ul, con un coeficiente de regresión lineal de 0.989. En los análisis rutinarios, se emplearon **50** µl de extracto para medir 6-PGDH.

Fig. 30. *Actividad 6PGDH.* Efecto del volumen de extracto ensayado en el aumento de $\Delta A_{340}/\text{min}$. La correlación se indica como R².



Glutación Peroxidasa (GPx). A partir del protocolo de Flohé y Günzler (1984), se caracterizó el ensayo de la GPx en *P. clarkii* (Tabla 18). La actividad dependía del hidroperóxido de cumeno, GSH, NADPH, de la glutación reductasa (enzima auxiliar) y de la enzima activa, siendo nula en el extracto hervido. Las concentraciones saturantes de los sustratos fueron: 1 mM de GSH, 0,15 mM de NADPH, 2 mM de cumeno-OOH, que se usaron en los ensayos rutinarios.

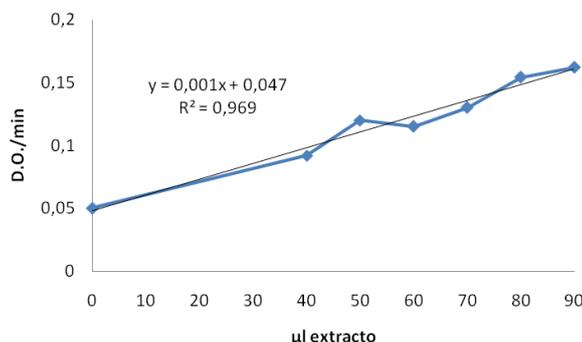
Tabla 18. *Caracterización del ensayo de la GPx en extractos crudos de P.clarkii.*

Sistema ^a	$\Delta A_{340}/\text{min}$ Total	$\Delta A_{340}/\text{min}$	$\Delta A_{340}/\text{min}$	Blanco
Completo	-0.122	-0.003	-0.119	-0.044
Sin GSH	-0.001	0.009	-0.011	
1 mM GSH	-0.187	-0.010	-0.177	-0.065
2 mM GSH	-0.182	-0.007	-0.175	-0.065
Sin cumeno-OOH	-0.003	-0.003	0.000	
4mM cumeno-OOH	-0.213	0.002	-0.215	-0.066
2mM cumeno-OOH	-0.225	0.005	-0.220	-0.066
Sin GSHRasa	-0.002	0.012	0.015	
GSHRasa (0.48U/ml)	-0.125	0.004	-0.129	-0.036
Sin NADPH	0.001	0.002	-0.001	
0.15 mM NADPH	-0.146	-0.172	-0.318	0.019
0.3 mM NADPH	-0.150	-0.184	-0.334	0.019
Completo, extracto hervido	-0.057	-0.003	-0.054	-0.044

^a.-se ensayaron 50ul de extracto de glándula digestiva de *P. clarkii* diluido 2 veces

El ensayo fue lineal hasta 90ul de extracto, con coeficiente de regresión lineal de 0.97 (Fig. 31). En los ensayos rutinarios se usaron **20** µl de extracto de glándula digestiva.

Fig. 31. *Actividad GPx.* Efecto del volumen de extracto en el $\Delta A_{340}/\text{min}$. La correlación se indica como R².



Glioxalasa II (Gliox II). Para caracterizar el ensayo partimos del protocolo de Regoli (1997). La Tabla 19 muestra que la actividad Gliox II resultó nula en extracto de glándula digestiva calentado a 100°C durante 10 minutos, confirmando la naturaleza enzimática del ensayo. Además, la actividad fue dependiente de S-D-lactoilglutión (LSG) y de DTNB, pues era indetectable cuando estos sustratos no se añadían al ensayo. Las concentraciones saturantes y por tanto óptimas para los ensayos de rutina fueron: 0.9mM LSG y 0.2mM DTNB, ya que tras duplicar dichas concentración no aumentó la actividad Gliox II.

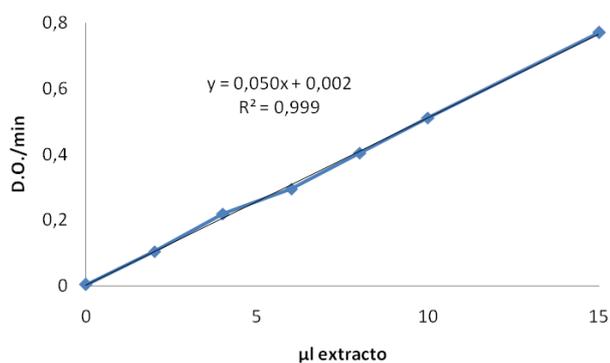
Tabla 19. *Caracterización del ensayo de la Glioxalasa II en extractos de P.clarkii.*

Sistema ^a	$\Delta A_{340}/\text{min}$
Completo	0.295
Sin LSG	0.005
0.9 mM LSG	0.297
1.8 mM LSG	0.292
Sin DTNB	0.000
0.2 mM DTNB	0.291
0.4 mM DTNB	0.305
Completo, extracto hervido	0.007

^a-se ensayaron 30ul de extracto de glándula digestiva diluida 5 veces.

La Fig. 32 muestra la actividad Gliox II frente al volumen de extracto. El ensayo fue lineal entre 1-20 μl de extracto (R^2 0.99) en un volumen final de 0.5 ml. En los análisis rutinarios, se emplearán **10 μl** de extracto.

Fig. 32. *Actividad Gliox II.* Efecto del volumen de extracto sobre el $\Delta A_{340}/\text{min}$. La correlación se indica como R^2 .



Glutación Transferasa (GST). A partir del protocolo de Habig et al (1974), se caracterizó el ensayo de GST en *P. clarkii* (Tabla 20). La actividad dependía de GSH y CDNB. El aumento de concentración de CDNB aumentó la actividad enzimática y la $\Delta A_{340}/\text{min}$ del blanco químico. Para los ensayos rutinarios de actividad se usaron 2 mM de GSH y 2 mM de CDNB.

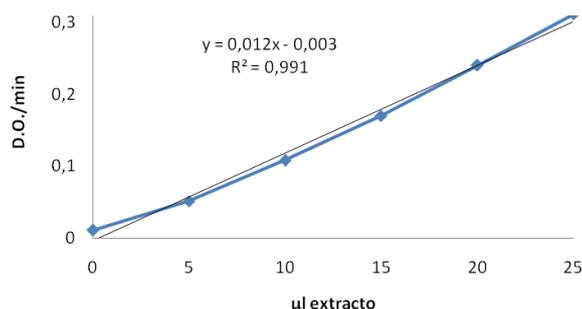
Tabla 20. *Caracterización del ensayo de la GST en extractos crudos de P.clarkii.*

Sistema ^a	$\Delta A_{340}/\text{min}$	Blanco químico
Completo	0.330	0.013
Sin GSH	0.001	0.001
2 mM GSH	0.325	0.013
4 mM GSH	0.319	0.014
8 mM GSH	0.351	0.026
Sin CDNB	0.001	0.002
2 mM CDNB	0.346	0.013
4 mM CDNB	0.486	0.053
8 mM CDNB	1.155	0.155
Completo, extracto hervido	0.007	0.013

a.-se ensayaron 15ul de extracto de glándula digestiva diluido 5 veces.

La linealidad del ensayo se estudió hasta 25 μl de muestra diluida 1/5 en tampón de extracción (Fig. 33). Para los ensayos rutinarios se usaron **20** μl de extracto diluido.

Fig. 33. *Actividad GST.* Efecto del volumen de extracto sobre el $\Delta A_{340}/\text{min}$. La correlación se indica como R^2 .



7-Etoxirresorrufina O-Desetilasa (EROD). Como la actividad era escasa en *P. clarkii*, partimos del protocolo de Fernandes *et al* (2002), que incubaba el extracto con los sustratos. La Tabla 21 muestra el ensayo EROD en microsomas de g. digestiva. La actividad fue nula tras hervir los microsomas 10 minutos y dependía de 7-etoxirresorrufina y NADPH, usando rutinariamente 0,2 mM y 3,32 μM .

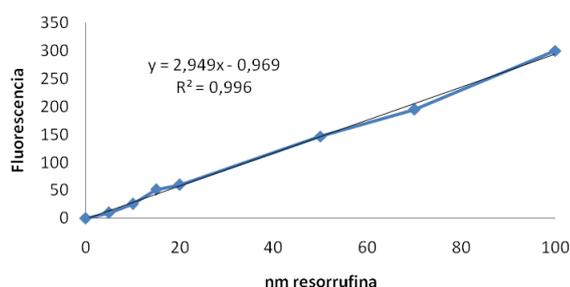
Tabla 21. *Caracterización del ensayo de la EROD en glándula digestiva de P.clarkii.*

Sistema ^a	D.O./min 340nm
Completo	101.9
Sin NADPH	21.42
0.2 mM NADPH	102.6
0.4 mM NADPH	103.7
Sin etoxiresorrufina	2.171
3.32 μM etoxiresorrufina	126.8
6.64 μM etoxiresorrufina	131.5
Completo, extracto hervido	19.34

^a.-se ensayaron 20ul de microsomas de g. digestiva incubados 60 minutos a 30°C.

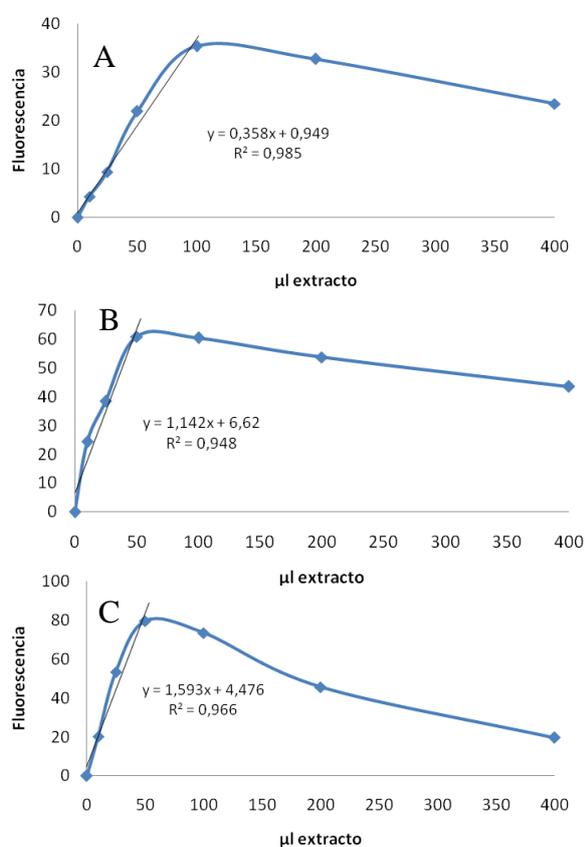
La resorrufina se midió por fluorimetría con una recta patrón (Fig. 34) para cuantificar el producto generado en los ensayos de actividad EROD.

Fig. 34. Recta patrón de resorrufina.



Para optimizar el ensayo de EROD en *P. clarkii*, se incubó la mezcla de reacción, durante 15, 30 y 60 minutos a 30°C. En cada caso, se estudió el efecto del volumen de extracto microsomal en la actividad EROD (Fig. 35 A, B y C). El ensayo resultó lineal hasta 100ul, 50ul y 50ul, cuando se incubaron los extractos durante 15, 30 y 60 min respectivamente. Resulta evidente que al ensayar volúmenes de extracto superiores a los indicados, la fluorescencia disminuyó, esto podría deberse a que la resorrufina fuera edliminada de la reacción por otra enzima también presente en el extracto microsomal.

Fig. 35. Actividad EROD. Efecto del volumen de extracto sobre la actividad. Las mezclas de ensayo fueron incubadas durante 15 (A), 30 (B) y 60 (C) minutos a 30°C.



II. 2 METALOTIONEINAS, MDA, GSH Y GSSG

Metaloioneina (MT). Partiendo del protocolo de Alhama (2006), se puso a punto el ensayo de MT en *P. clarkii*. Estudiamos las concentraciones de DTT, mBBr y SDS: mientras en *S. plana* el óptimo de DTT fue 2mM, para *P. clarkii* fue necesario 4mM de DTT para reducir totalmente la muestra. En cambio, concentraciones de mBBr y DTT superiores a 12 mM y 10 mM disminuían el área del pico de MTs, quizás debido al consumo de DTT por parte del mBBr. Igualmente, el % de SDS influyó en la cantidad de MTs. El pico de MTs aumento a medida que se incrementó el SDS y se estabilizó a partir del 4 % de SDS. Las concentraciones de DTT, mBBr y SDS, utilizadas rutinariamente fueron: 10mM, 12mM y 4 % SDS, respectivamente (Fig. 36. A, B y C).

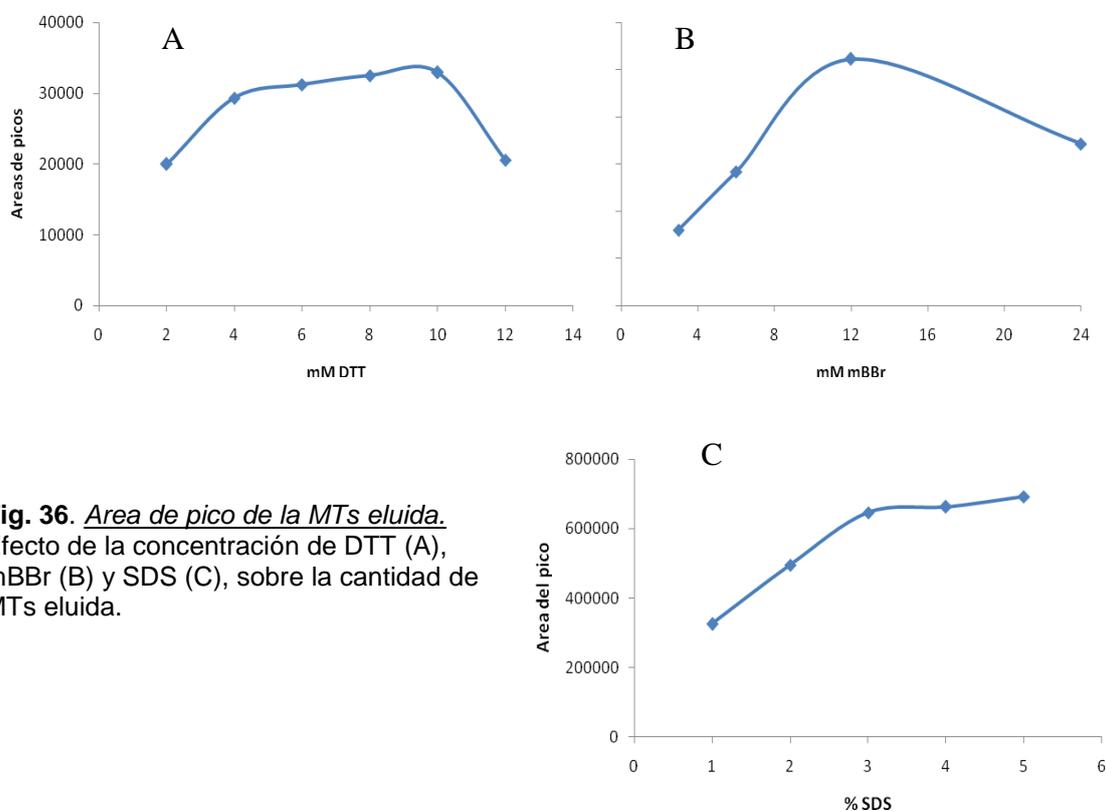
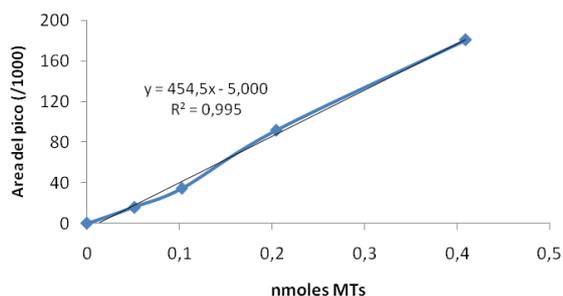


Fig. 36. Area de pico de la MTs eluida. Efecto de la concentración de DTT (A), mBBr (B) y SDS (C), sobre la cantidad de MTs eluida.

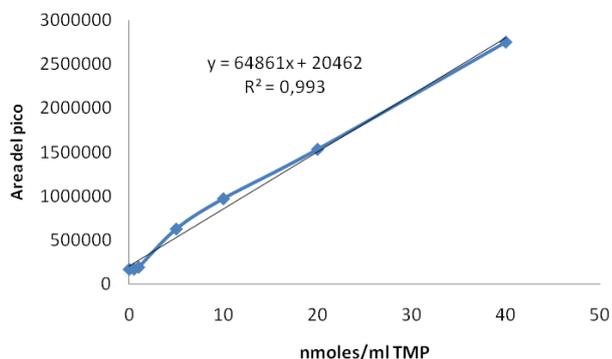
La recta patrón con MTs comercial de conejo (Fig. 37) nos permitió cuantificar la MTs que contenían las muestras problema.

Fig. 37. Recta patrón con MTs comercial.



Malondialdehído (MDA). Los niveles de MDA, en glándula digestiva de *P. clarkii*, se midieron fluorimétricamente siguiendo el protocolo de Almeida et al (2004). Elaboramos una recta patrón (Fig. 38) con tetrametoxipropano (TMP) para cuantificar MDA en los extractos.

Fig. 38. Recta patrón con TMP



Glutación reducido (GSH) y oxidado (GSSG). Para determinar las formas solubles de GSH y GSSG, seguimos el protocolo descrito en Ruiz-Laguna et al (2001). Las rectas patrón obtenidas con GSH (Fig. 39.A) y GSSG (Fig. 39.B) comercial nos permiten determinar los niveles de glutación en los extractos de glándula digestiva de *P. clarkii*.

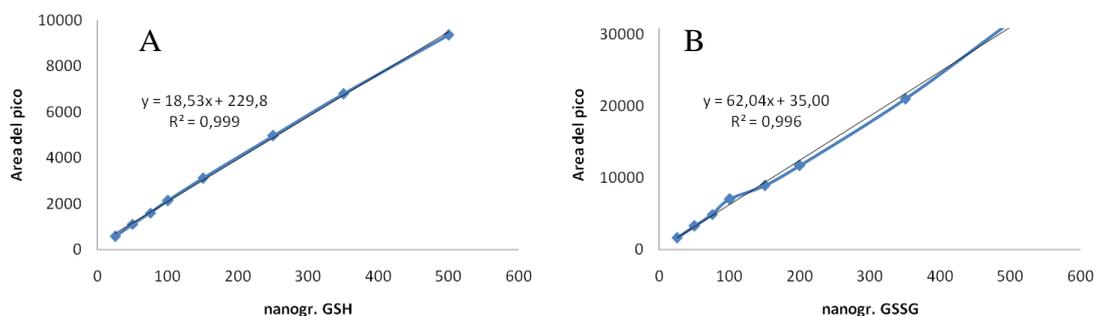


Fig. 39. Recta patrón con GSH (A) y GSSG (B)

III. PUESTA A PUNTO DE LOS GELES 2D EN VARIOS TEJIDOS DE *P. CLARKII*

III.1 PROTEOMAS DE MÚSCULO, TEJIDO NERVIOSO Y GLÁNDULAS DIGESTIVA EN GELES 7CM.

Se extrajeron proteínas de diferentes tejidos de *P. clarkii* en tampón 20mM Tris HCl, pH 7.6, 0.5M Sacarosa, 0.15M KCl y 150 μ l/gr de un coctel de inhibidores de proteasas (AEBSF, EDTA, bestatina, E-64, leupeptina y aprotinina). Tras desnaturalizar en 7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 20mM DTT, 0.5% Pharmalyte 3-10, las proteínas se separaron en tiras IPG de 7 cm, pH 3-10 (D1), y luego en geles de poliacrilamida (D2). Tras teñir con plata, obtuvimos una visión general a pequeña escala de los proteomas de músculo, tejido nervioso (Fig. 40) y glándula digestiva (Fig. 41). Los de tejido nervioso y músculo se extendían por todo el rango de Mr y pl (4-7), por ello elegimos las tiras IPG de pH 4-7 para estudios sucesivos (Fig. 40. A-D).

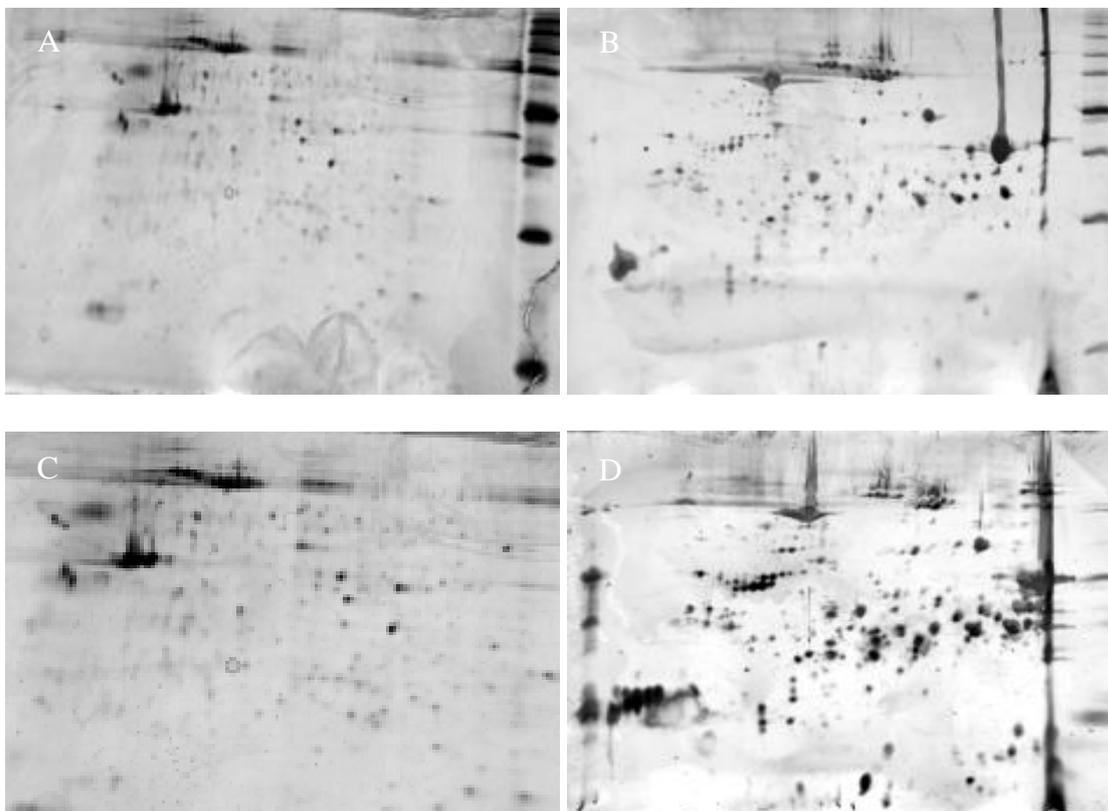
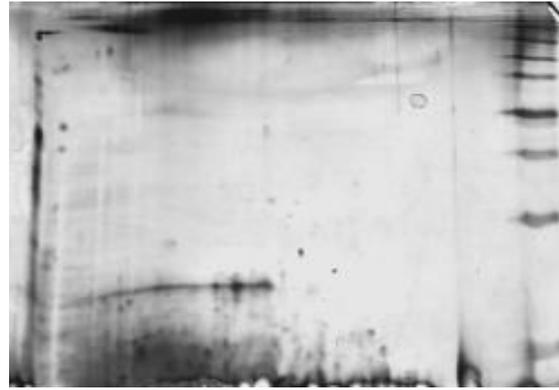


Fig. 40. *Proteínas soluble de tejido nervioso (A) y músculo (C) de P. clarkii (7cm, pH 3-10) y de tejido nervioso (B) y músculo (D) (7cm, pH 4-7). 50ug proteína. Tinción plata.*

A diferencia de los resultados obtenidos en tejido nervioso y músculo, en extractos de glándula digestiva, siguiendo el mismo protocolo, sólo obtuvimos manchas en la mitad inferior del gel (bajo Mr) (Fig. 41). La satisfactoria separación de proteínas inicial obtenida en los dos tejidos anteriores contrastó con la casi total ausencia de manchas en glándula digestiva.

Fig. 41. *Proteínas soluble de glándula digestiva de P. clarkii*. (7cm, pH 3-10). Se cargaron 50ug de proteína. Tinción con plata.



Como en Toxicología la glándula digestiva es muy interesante para buscar biomarcadores de contaminación y su proteoma no tenía proteínas de alto Mr, quizás debido a proteólisis, nos propusimos mejorar estos resultados y poder utilizar este proteoma en futuros análisis. Al añadir a estos extractos diferentes cocteles de inhibidores de proteasas (comercial y casero) en diferentes concentraciones pudimos visualizar manchas en la zona superior del gel (Fig. 42 y 43).

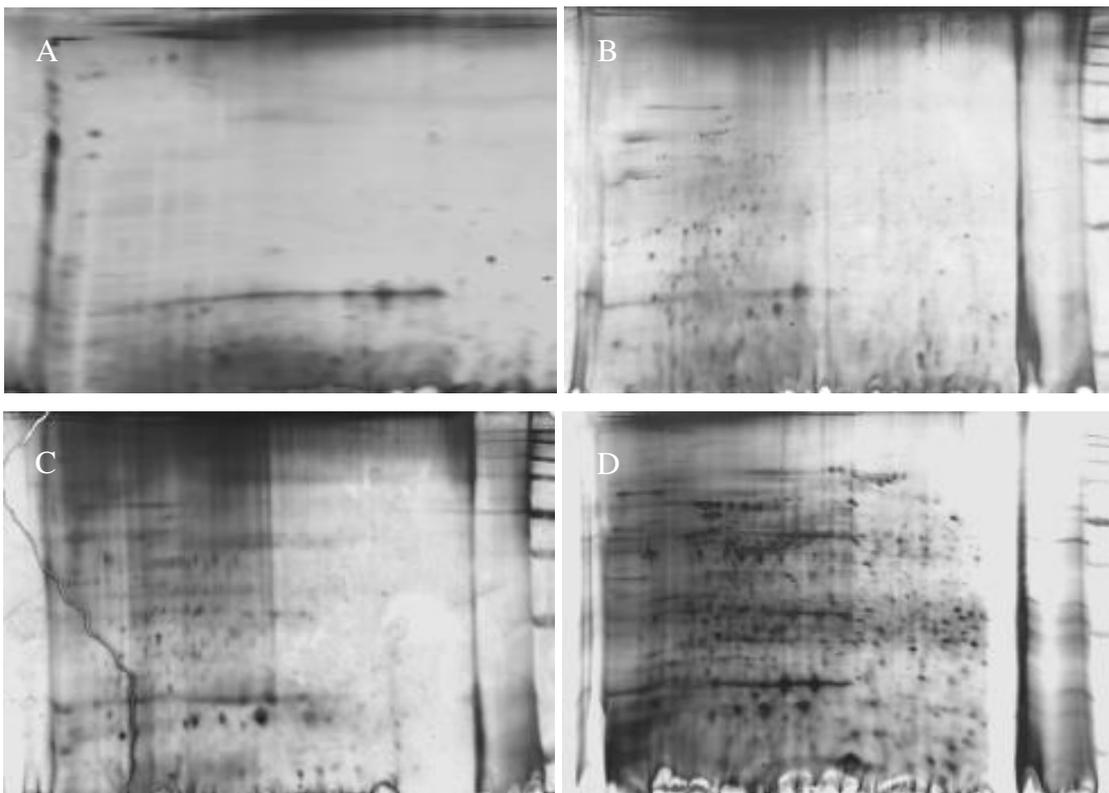


Fig. 42. *Proteoma de glándula digestiva de P. clarkii* (IPG 7cm, pH 4-7). Los geles se realizaron cargando 50ug proteína. A) Extracto con 0.5mM PMSF, 0.006mM leupeptina. B) , C) y D) Extractos conteniendo 100 µl , 300 µl y 600 µl de coctel casero de inhibidores de proteasas preparado con AEBSF, EDTA, bestatina, E-64, leupeptina, aprotinina, ácido aminohexanoico, antipaina, benzamidina, quimostatina, pestatina A, fosforamidon e inhibidor de tripsina.

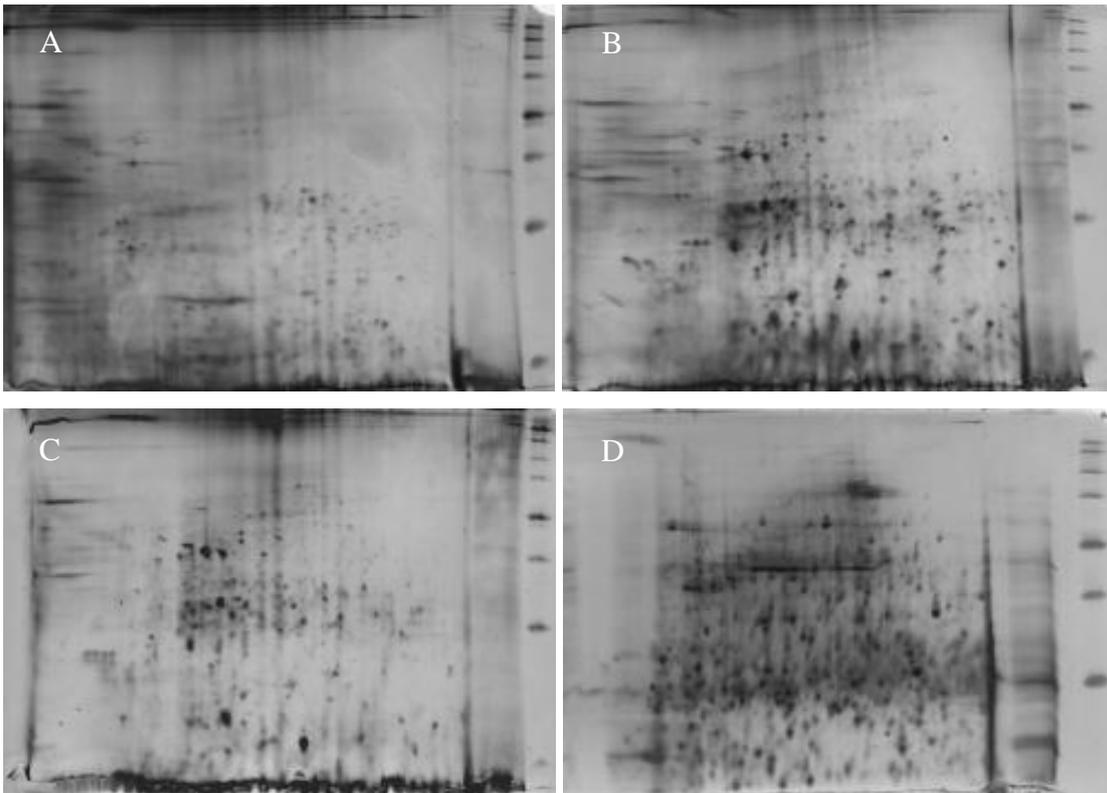


Fig. 43. *Proteoma de glándula digestiva de P. clarkii* (IPG 7cm, pH 4-7). Los geles se realizaron cargando 50ug proteína. A), B) , C) y D) Extractos conteniendo 200 µl , 300 µl, 400 µl y 600 µl de coctel comercial de inhibidores de proteasas (Ref. Sigma P 2714) que contenía: AEBSF, EDTA, bestatina, E-64, leupeptina y aprotinina.

No obstante, el uso excesivo de inhibidores de proteasas aumentaba la complejidad de la muestra y participaba en la aparición de fenómenos de streaking y desenfoque. Para evitar dichos problemas, probamos distintas estrategias alternativas para la extracción de proteínas. Entre ellas se investigó la extracción en tampón desnaturizante (7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 20mM DTT) (Fig. 44. A), usando diferentes concentraciones de DTT, CHAPS y carga proteica y la liofilización del tejido. Estos protocolos no mejoraron los problemas de proteolisis y significaron una pérdida de proteínas importante.

Otra estrategia ensayada para eliminar compuestos lipídicos que podrían afectar al enfoque de proteínas y evitar la pérdida de proteína fue la precipitación de proteínas de glándula digestiva. Se usaron diferentes alternativas, como la precipitación con HCl:etanol:cloroformo, con sílice C8, con Tritón 100 y con acetonitrilo. Las precipitaciones tuvieron resultados diferentes dependiendo del método usado (Fig. 44. B, C, D, E y F). No obstante, ninguno de estos tratamientos logró superar el efecto de la presencia de altas concentraciones de inhibidores de proteasas durante la extracción de las proteínas.

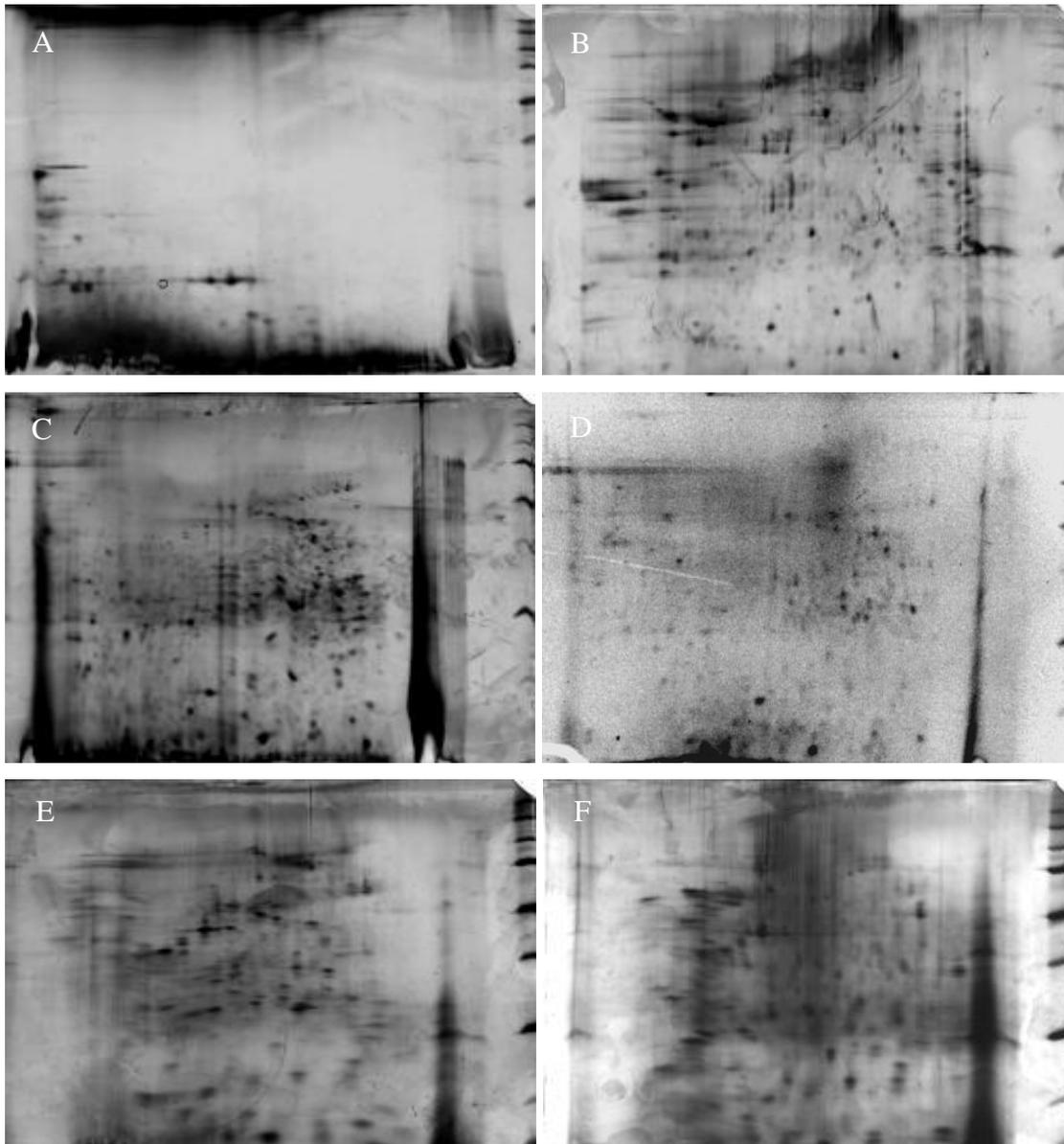


Fig. 44. *Proteoma de glándula digestiva de P. clarkii.* (7cm, pH 4-7.). Los geles se realizaron cargando 50ug proteína. A) Tampón extracción: 7M Urea, 2M thiourea, 20mM DTT, 0.5% tritón X100 en Tris HCL 20mM, pH 7.6. B) Precipitado con HCl: etanol: cloroformo; C y D) Precipitado con silice C8, tinción plata (C) y sypro (D); E) Precipitado con Tritón X114. F) Precipitado con Acetonitrilo. El tampón extracción para los extractos B, C, D, E y F fue: Tris HCL 20mM, pH 7.6. 0.5M Sacarosa, 0.15M KCl, 150µl de cóctel de inhibidor de proteasas comercial /gr. de tejido.

A diferencia de los tratamientos que se acaban de mencionar, las precipitaciones con TBP:acetona:metanol, ácido tricloroacético (TCA) y el uso del kit ReadyPrep 2-D cleanup (Bio-Rad) dieron los mejores resultados, sin apenas pérdida de proteínas y geles 2-DE aceptables (Fig. 45). La tinción con Sypro-ruby no mostró mayor sensibilidad que la tinción con plata.

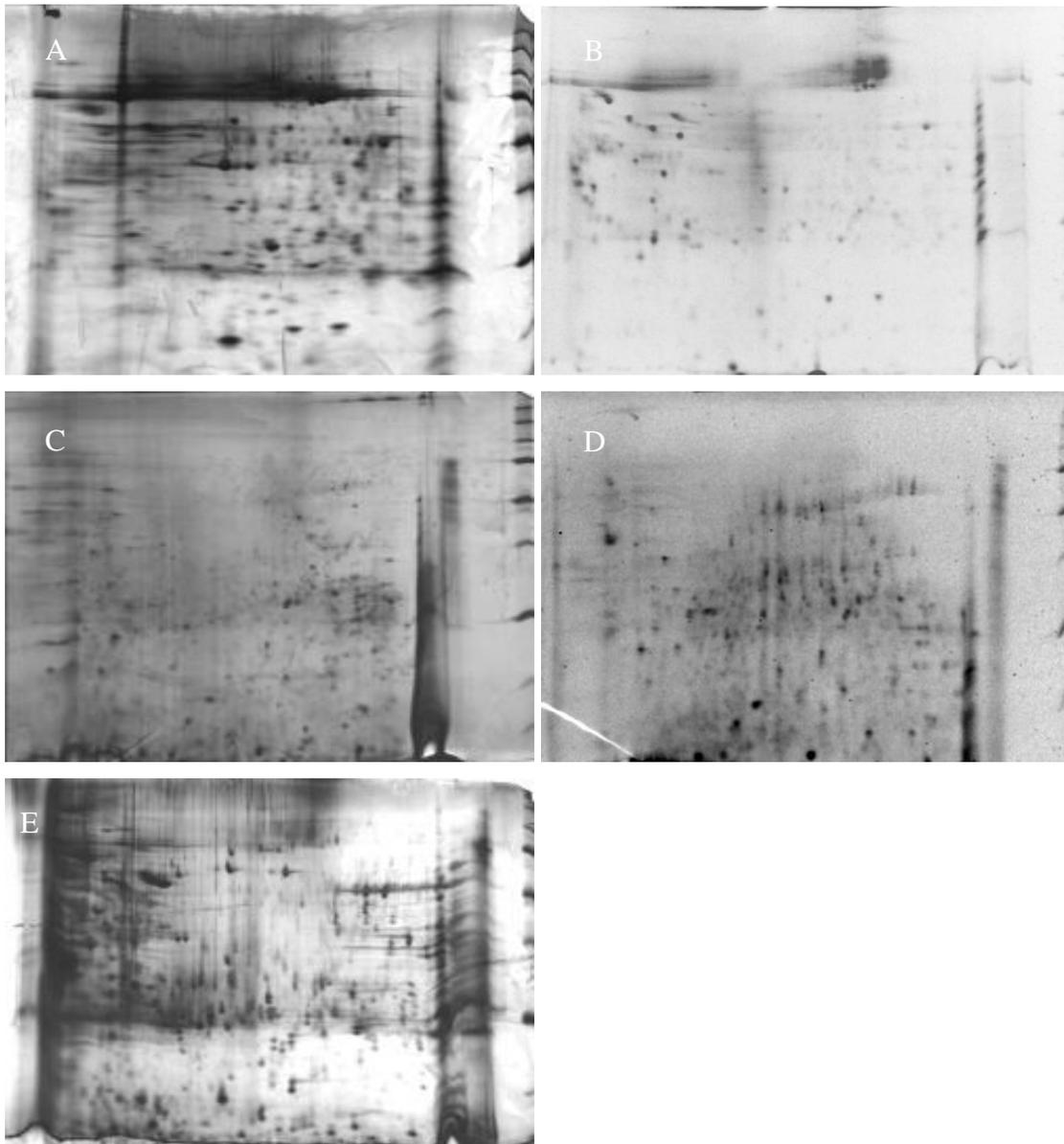


Fig. 45. *Proteoma de glándula digestiva de P. clarkii* (7cm, pH 4-7). Los geles se realizaron cargando 50 ug proteína. **A y B:** Precipitado con TBPosfato:acetona:metanol, tinción plata (A) y tinción Sypro (B). **C y D:** Precipitado con TCA, tinción plata (C) y tinción Sypro (D). **E:** Precipitado con kit ReadyPrep 2-D cleanup (Bio-Rad), tinción plata. Tampón extracción:Tris HCL 20mM, pH 7.6. 0.5M Sacarosa, 0.15M KCl, 150µl de cóctel de inhibidor de proteasas comercial/gr. de tejido.

III.2. PROTEOMAS DE MÚSCULO, TJ. NERVIOSO, GL. DIGESTIVA Y BRANQUIAS, GELES 18 CM.

Para aumentar la resolución los análisis en geles de 7cm se repitieron en geles de mayor tamaño. Extractos citosólicos de branquias, músculo, tejido nervioso y glándula digestiva de *P. clarkii* se cargaron en tiras IPG de 18 cm. con rango de pH 4-7 (Fig. 46). La tinción con plata resolvió ~3000 proteínas en branquias, músculo y tejido

nervioso o 500 en glándula digestiva. Los diferentes tejidos mostraron un patrón de manchas particular, distinguible a simple vista.

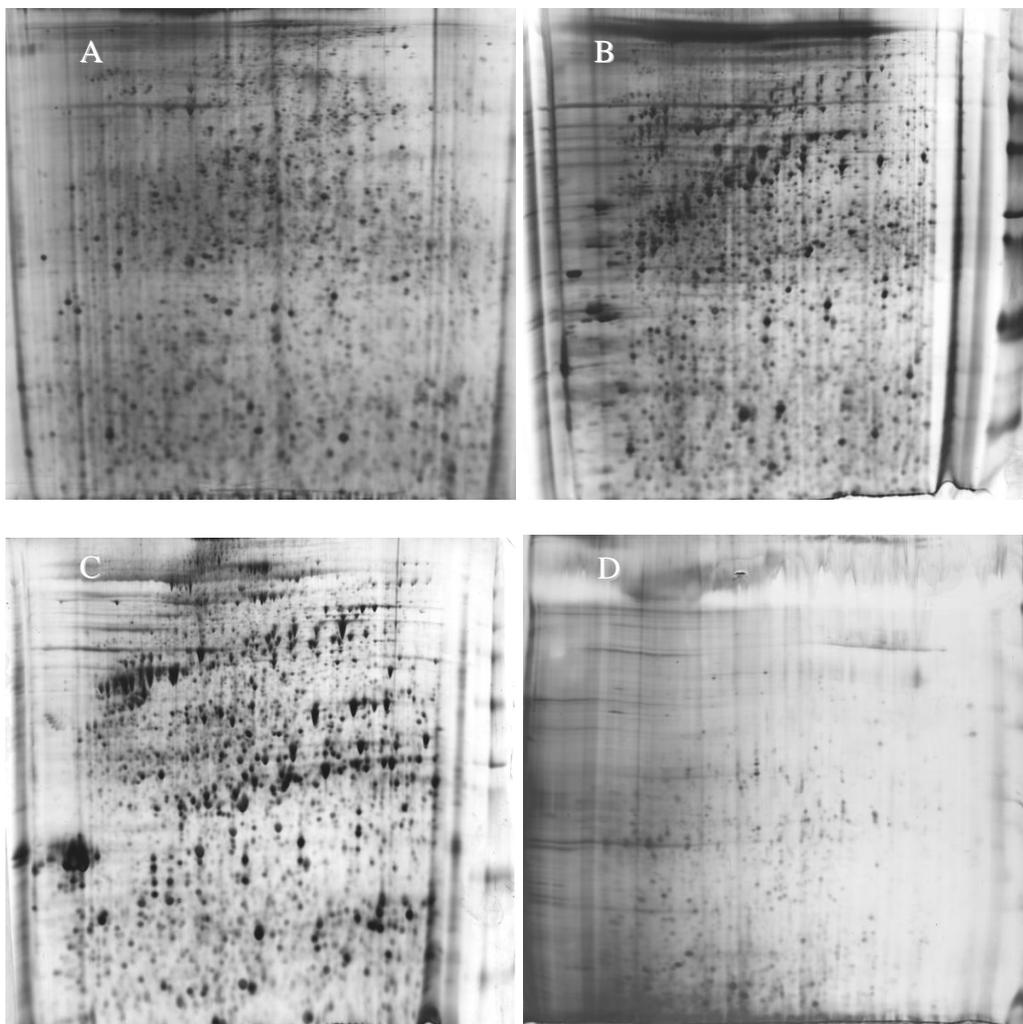


Fig. 46. *Proteoma de diferentes tejidos de P. clarkii.* (18cm, pH 4-7.). Los geles se realizaron cargando 100 ug proteína. A) Branquias, B) Tejido nervioso, C) Músculo y D) Glándula digestiva. Tampón extracción: Tris HCL 20mM, pH 7.6. 0.5M Sacarosa, 0.15M KCl, 150µl o 300µl de cóctel de inhibidor de proteasas comercial/gr. de tejido. Tinción plata.

Se investigó también la carga de proteínas y la relación tampón extracción/peso de tejido. En músculo, se cargaron 100, 150 y 200 µg de proteína, se observó un aumento de manchas a medida que aumentamos la carga. La aparición de streaking y el aumento de ruido de fondo en el gel de 200 µg confirma la saturación de la tira, 150 µg se consideró la carga óptima de proteínas (Fig. 47).

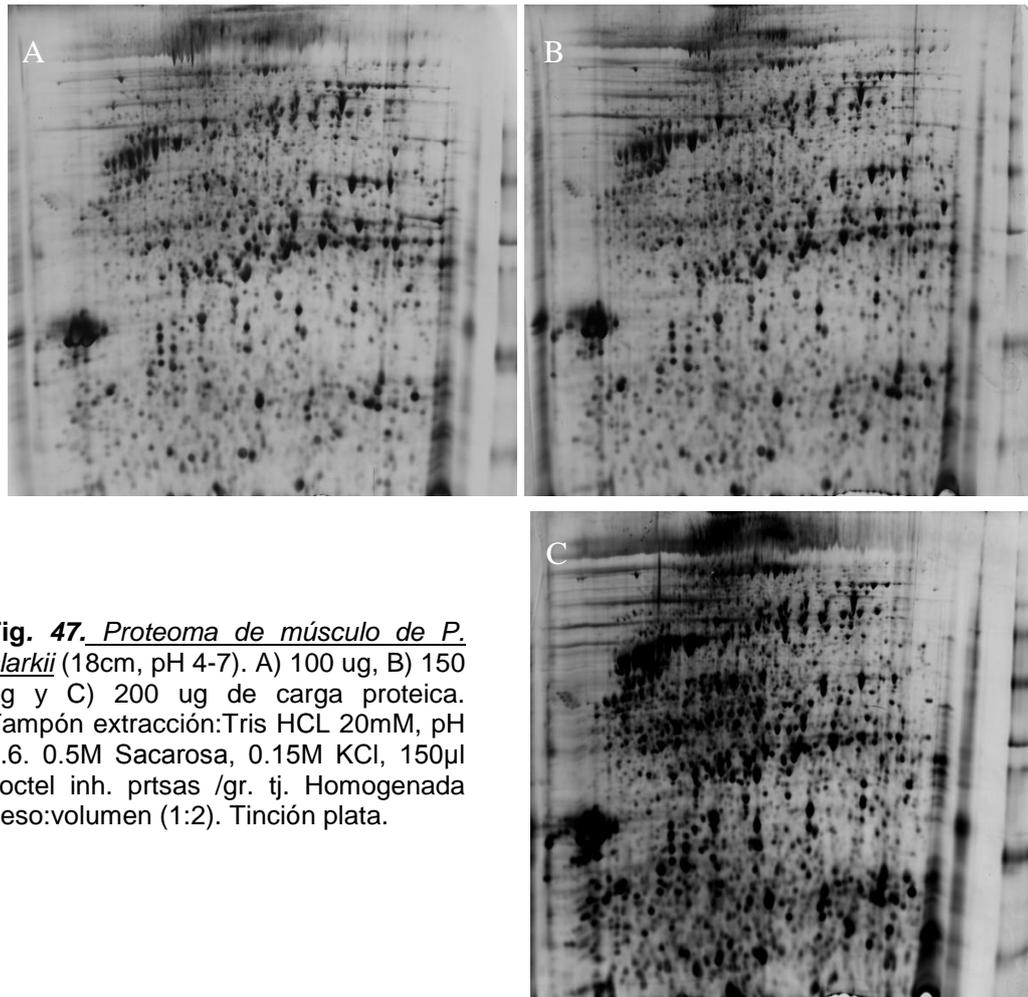


Fig. 47. *Proteoma de músculo de P. clarkii* (18cm, pH 4-7). A) 100 ug, B) 150 ug y C) 200 ug de carga proteica. Tampón extracción: Tris HCL 20mM, pH 7.6. 0.5M Sacarosa, 0.15M KCl, 150µl coctel inh. prtsas /gr. tj. Homogenada peso:volumen (1:2). Tinción plata.

La relación tampón extracción:peso (1:2) en músculo fue mejor que la 1:4 (Fig. 48). El menor enfoque de los extractos más diluidos podría deberse al mayor volumen de extracto en la mezcla de carga, que transformará más las condiciones del tampón.

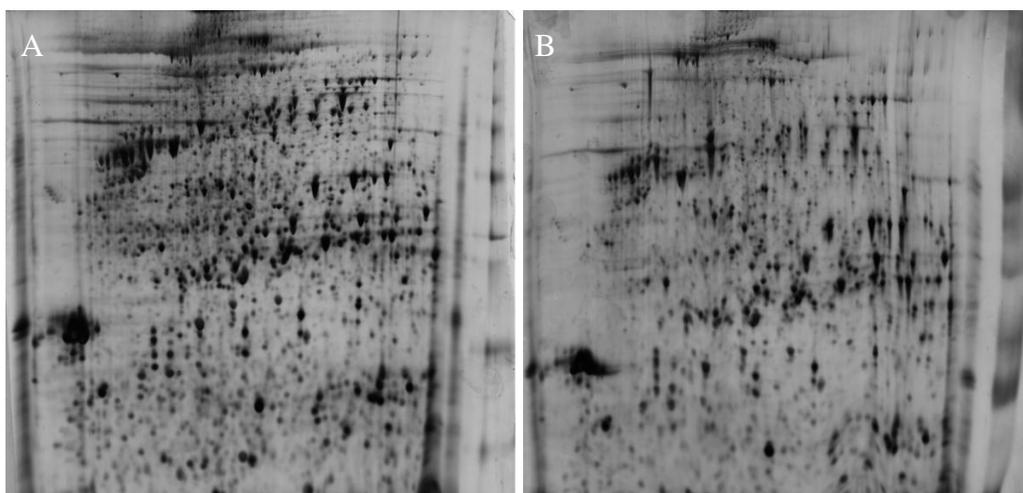


Fig. 48. *Proteoma de músculo de P. clarkii*. (18cm, pH 4-7). Carga proteica 100ug. A) Homogenado (1:2), B) Homogenada (1:4). Tampón extracción: ver Fig anterior. Tinción plata.

En tejido nervioso se cargaron 100, 150, 200 y 250 μg de proteína. El número de manchas, la aparición de streaking y el ruido de fondo aumentó con la carga proteica (Fig. 49). Para los análisis comparativos de imágenes se cargaron 150 μg de proteína, pues los geles con esta carga presentaban un gran número de manchas y menores problemas de enfoque. Como en músculo, la extracción del homogenado 1:2 (tampón extracción:peso) tuvo mejor enfoque que la extracción llevada a cabo con una relación 1:4 (datos no mostrados).

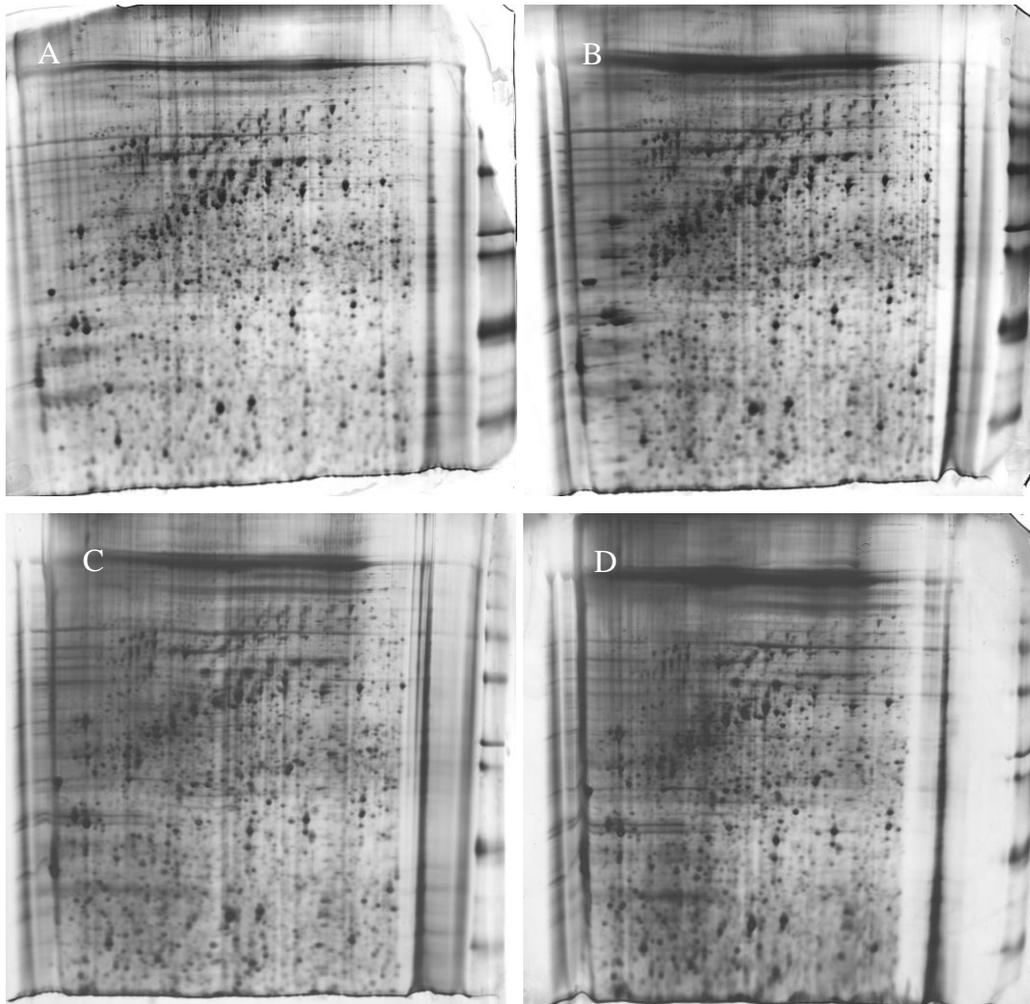


Fig. 49. *Proteoma de tejido nervioso de P. clarkii.* (18cm, pH 4-7). A) 100ug, B) 150 ug, C) 200 ug y D) 250 ug de carga proteica. Tampón extracción: ver Figura anterior. Homogenado peso:volumen (1:2). Tinción plata.

En branquias, investigamos el uso de tiras IPG de diferente rango de pH y la extracción de proteínas en tampón desnaturizante, 7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 20mM DTT, usando geles de 18 cm. La mayoría de las proteínas solubles de branquias se localizaron en el rango de pH 4-7 (Fig. 50), por lo que se escogió este rango estrecho de pH para los posteriores estudios proteómicos, tanto con este órgano como con los demás.

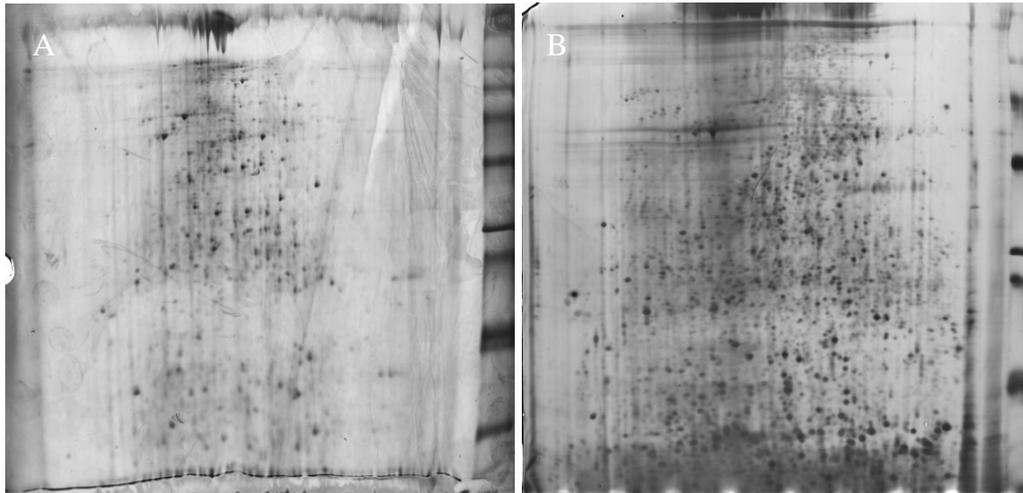


Fig. 50. *Proteoma de branquias de P. clarkii*. (18cm) Carga proteica 100ug, homogenado peso:volumen (1:1), tampón de extracción: ver Figura anterior. Tinción plata A) Tiras IPG pH 3-10 y B) Tiras IPG pH 4-7.

La extracción de proteínas de branquias en tampón desnaturizante nos dio geles con calvas en la zona básica de altos pesos moleculares y problemas de desenfoque (Fig. 51).

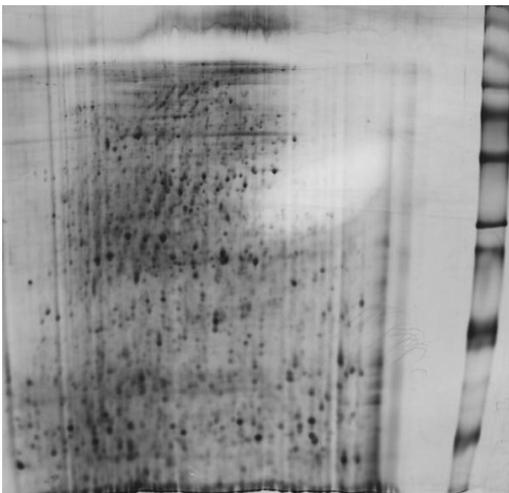


Fig. 51. *Proteoma de branquias de P. clarkii*. (18cm, pH 4-7). Carga proteica 100ug. Extracción en tampón desnaturizante, 7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 20mM DTT, homogenado peso:volumen (1:1), Tinción plata.

En la Fig. 52 se resume el estudio de la carga proteica en branquias. Se cargaron 100, 150, 200 y 250 μ g de proteína en geles de 18cm, rango de pH 4-7. El número de manchas aumentó con la carga proteica. Para los análisis comparativos de imágenes se cargaron 150 μ g de proteína, pues los geles con esta carga presentaban un gran número de manchas bien enfocadas.

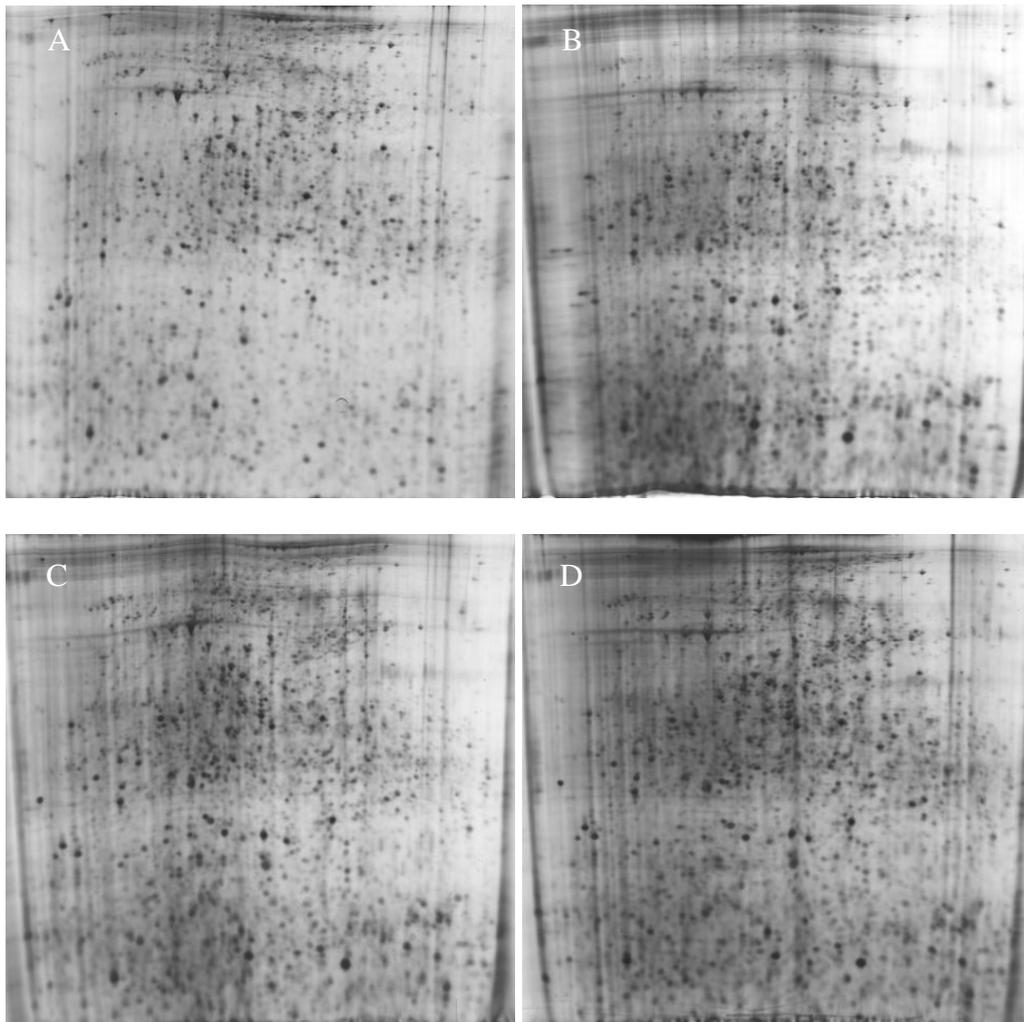


Fig. 52. *Proteoma de branquias de P. clarkii.* (18cm, pH 4-7). A) 100ug, B) 150 ug, C) 200 ug y D) 250 ug de carga proteica. T. extracción: ver Fig. anterior. Homogenada p:v (1:2). T. plata.

De nuevo, con la extracción 1:2 (t. extracción: peso) del homogenado de branquias conseguimos mejor enfoque de las proteínas que con 1:4 (Fig. 53).

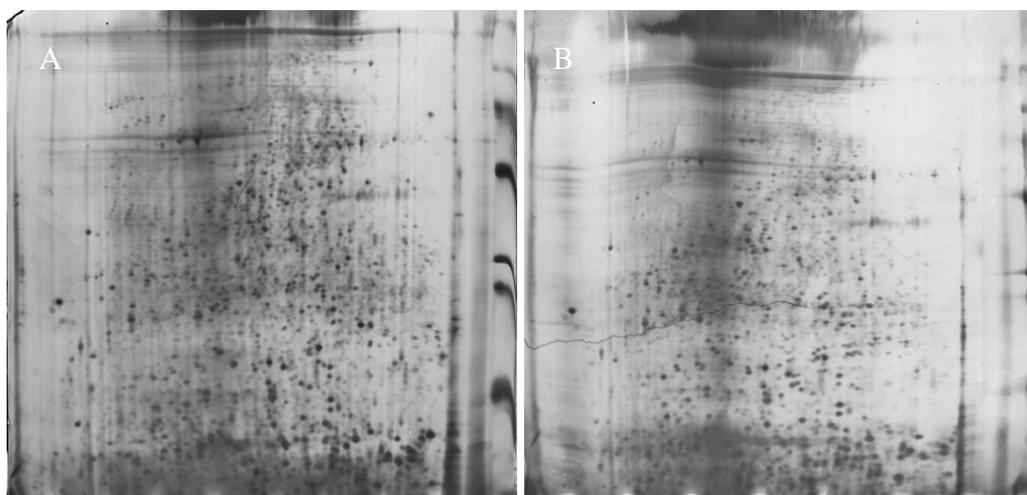


Fig. 53. *Proteoma de branquias de P. clarkii.* (18cm, pH 4-7). Carga proteica 100ug. A) Homogenado peso:volumen (1:2), B) (1:4). Tampón extracción: ver Figura anterior. Tinción plata

Una vez establecidas las condiciones de extracción de muestra para obtener proteomas de tejido nervioso, músculo y branquias en geles 2D de gran tamaño, usamos los geles de branquias y tejido nervioso en el análisis comparativo de imágenes, por su elevada resolución/ reproducibilidad e importancia en Toxicología. Los proteomas de tejido nervioso y branquias de cangrejos expuestos a plaguicida se compararon con sus controles sin tratar (geles de 18cm) y los proteomas de branquias de cangrejos del PND con los de los alrededores del Parque (geles de 24). Las proteínas con expresión alterada podrían ser nuevos biomarcadores de contaminación no sesgada que ampliarían la batería de biomarcadores bioquímicos estudiados en los experimentos de exposición a plaguicidas y en el seguimiento/evaluación de la contaminación de Doñana.

IV. EFECTOS BIOQUÍMICOS Y PROTEÓMICOS TRAS EXPONER *P. clarkii* A CLORPIRIFOS (OP) Y A CARBARIL (CM).

IV.1. EFECTO *IN VIVO* DEL CLORPIRIFOS Y DEL CARBARIL SOBRE LAS ESTERASAS DE *P. clarkii*

La Fig. 54 muestra la inhibición de las actividades AChE y CbE por clorpirifos (plaguicida de tipo OP). La CbE resultó inhibida a los 2 y 7 días de exposición de forma proporcional a la dosis usada, alcanzando una inhibición casi total tras 7 días de exposición en presencia de dosis moderadas de organofosforado. Aunque la AChE aumentó su actividad a los 2 días de exposición a baja concentración de plaguicida, también resultó inhibida de modo proporcional a la concentración de OP a los 7 días de exposición. Una semana tras la retirada del plaguicida no fue suficiente para recobrar las actividades AChE y CbE iniciales, que se mantuvieron por debajo del control y de los valores de los animales no expuestos al inicio del experimento.

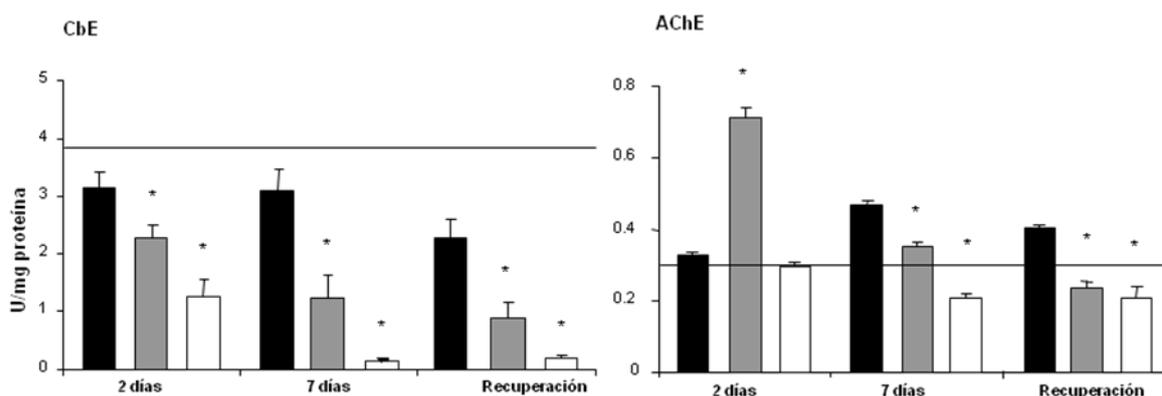


Fig. 54. *Evolución de las actividades CbE y AChE de *P. clarkii* expuestos a clorpirifos:* CbE (gl. digestiva) y AChE (t. nervioso) expuesto a baja (■) y moderada (□) concentración de clorpirifos durante 2 y 7 días, y 7 días tras retirar el plaguicida, comparado con el control correspondiente (■) y a la actividad que mostraban los animales no expuestos al inicio del experimento (T0, —), en los que CbE y AChE eran 3.84 ± 0.73 y 0.30 ± 0.01 , respectivamente. Los datos muestran las medias \pm error estándar de 5 cangrejos. La significación estadística frente al control respectivo se muestra como * $p < 0.05$.

El carbaril (plaguicida de tipo CM) tuvo un efecto inhibitorio bastante menor que el clorpirifos sobre ambas actividades esterasas (Fig. 55). La CbE fue inhibida a los 7 días de exposición a ambas concentraciones, pero no a los 2 días, mientras que la AChE no fue inhibida a ninguna de las dos concentraciones y tiempos de exposición ensayados. Al contrario que en la exposición al OP, donde no se apreció recuperación de ninguna de las dos esterasas tras retirar el plaguicida, se observaron aumentos significativos tanto de AChE como de CbE tras retirar el carbaril.

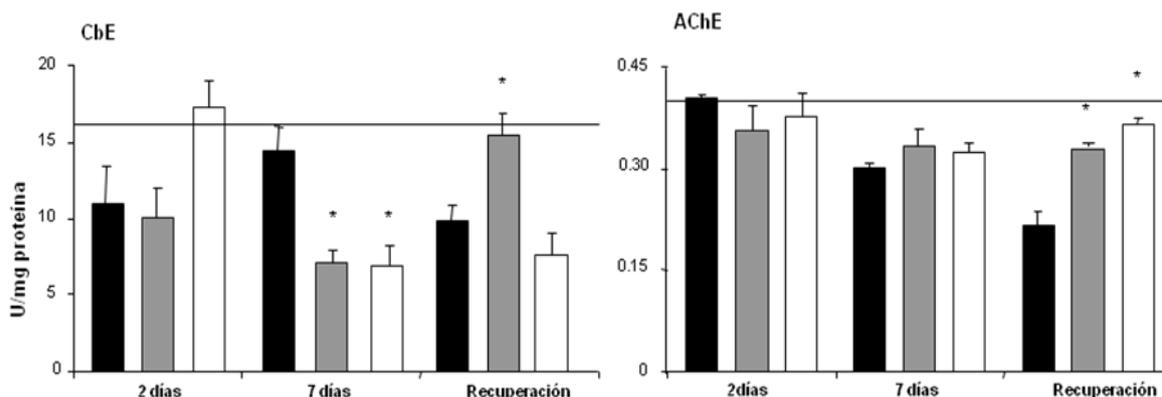


Fig. 55. Evolución de las actividades CbE y AChE de *P. clarkii* expuestos a carbaril: CbE (gl. digestiva) y AChE (t. nervioso) expuesto a baja (■) y moderada (□) concentración de carbaril durante 2 y 7 días, y 7 días tras retirar el plaguicida, comparado con el control correspondiente (■) y a la actividad que mostraban los animales no expuestos al inicio del experimento (T0, —), en los que CbE y AChE eran 16.2 ± 1.73 y 0.41 ± 0.01 , respectivamente. Los datos muestran las medias \pm error estándar de 5 cangrejos. La significación estadística frente al control respectivo se muestra como * $p < 0.05$.

A la busca de posibles diferencias en el proceso de reactivación tras el tratamiento con ambos tipos de plaguicida, extractos de tejido nervioso y glándula digestiva de cangrejos que habían sido expuestos a dos concentraciones de clorpirifos o carbaril fueron diluidos o tratados con 2-PAM, como se describe en el capítulo anterior. La Tabla 22 muestra que los extractos de cangrejos tratados *in vivo* con clorpirifos, con inactivación apreciable de la AChE sólo a los 7 días de exposición, no mostraron signos de reactivación por dilución ó tratamiento con 2-PAM, a diferencia de lo encontrado en la exposición *in vitro* a este plaguicida organofosforado.

Tabla 22. Reactivación de la actividad AChE de cangrejos expuestos a clorpirifos. Extractos de t. nervioso fueron tratados con 2-PAM o diluidos en tampón de extracción. Los datos (U/mg) son las medias \pm error estándar de 5 cangrejos. La significación estadística frente al control respectivo se muestra como * $p < 0.05$ o ** $p < 0.01$.

Muestra		Sin Tratar	+30-veces diluc.	+0.5 mM 2-PAM +30-veces diluc.
0 días	T0	0.30 ± 0.05	0.27 ± 0.04	0.30 ± 0.06
	Control	0.32 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.37 ± 0.05
2 días Exp.	½ LC50	0.32 ± 0.02	0.28 ± 0.05	0.32 ± 0.03
	LC50	0.29 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.29 ± 0.01
	Control	0.49 ± 0.04 (*)	0.32 ± 0.06 (*)	0.34 ± 0.03 (**)
7 días Exp.	½ LC50	0.35 ± 0.07 (*)	0.39 ± 0.02 (*)	0.34 ± 0.06
	LC50	0.28 ± 0.05	0.28 ± 0.01	0.25 ± 0.05
	Control	0.40 ± 0.08 (*)	0.38 ± 0.07	0.42 ± 0.02
7 días Recup.	½ LC50	0.24 ± 0.07	0.27 ± 0.05	0.24 ± 0.05
	LC50	0.26 ± 0.02 (*)	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.6

La Tabla 23 muestra una mayor sensibilidad de la CbE, que fue drásticamente inhibida incluso a los 2 días de tratamiento, aunque de nuevo la dilución por sí sola fue incapaz de reactivar la CbE, siendo sólo apreciable cierta reactivación por la dilución combinada con el tratamiento con 2-PAM, del mismo orden de los resultados obtenidos al estudiar la reactivación de los extractos inactivados *in vitro*.

Tabla 23. *Reactivación de la actividad CbE de cangrejos expuestos a clorpirifos.* Extractos de gl. digestiva tratados con 2-PAM o diluidos en tampón de extracción. Ver leyenda anterior.

Muestra		Sin Tratar	+50-veces diluc.	+1 mM 2-PAM +50-veces diluc.
0 días	T0	3.83±0.73	2.58±0.48	3.55±0.69
2 días Exp.	Control	3.14±0.26	1.86±0.16(**)	2.91±0.33
	½ LC50	2.25±0.25(*)	1.37±0.13(*)	1.67±0.17
	LC50	1.22±0.30(*)	1.22±0.25	1.89±0.38
7 días Exp.	Control	3.10±0.35	2.27±0.42	2.64±0.31
	½ LC50	1.28±0.40(*)	0.78±0.26	0.63±0.23
	LC50	0.15±0.01(*)	0.10±0.04	0.28±0.02(*)
7 días Rep.	Control	2.26±0.33	1.42±0.25	2.22±0.36
	½ LC50	0.88±0.27(*)	0.64±0.15	1.27±0.30
	LC50	0.20±0.03(*)	0.19±0.05	0.49±0.09(*)

La Tabla 24 muestra la falta de sensibilidad a la exposición *in vivo* a carbaril de la AChE, que no se inactivó significativamente a ninguna de las concentraciones y tiempos de exposición estudiados, y la falta de reactivación promovida por dilución o tratamiento con 2-PAM de esta actividad esterasa.

Tabla 24. *Reactivación de la actividad AChE de cangrejos expuestos a carbaril.* Extractos de t. nervioso fueron tratados con 2-PAM o diluidos en tampón de extracción. Ver leyenda anterior.

Muestra		Sin Tratar	+30-veces diluc.	+0.5 mM 2-PAM +30-veces diluc.
0 días	T0	0.41±0.02	0.37±0.04	0.43±0.07
2 días Exp.	Control	0.40±0.02	0.39±0.02	0.42±0.04
	½ LC50	0.36±0.02	0.32±0.06	0.38±0.07
	LC50	0.37±0.02	0.34±0.07	0.33±0.05
7 días Exp.	Control	0.37±0.04	0.36±0.02	0.34±0.04
	½ LC50	0.34±0.07	0.25±0.03(**)	0.37±0.04
	LC50	0.35±0.06	0.34±0.01	0.36±0.01
7 días Rep.	Control	0.37±0.03	0.32±0.05	0.25±0.02(*)
	½ LC50	0.32±0.01(*)	0.28±0.06(**)	0.35±0.03
	LC50	0.35±0.05	0.31±0.00	0.38±0.02

La Tabla 25 muestra la poca sensibilidad a la exposición *in vivo* a carbaril de la CbE, que sólo se inactivó significativamente a los 7 días de exposición, y la falta de reactivación promovida por dilución o tratamiento con 2-PAM de esta esterasa.

Tabla 25. *Reactivación de la actividad CbE de cangrejos expuestos a carbaril.* Extractos de gl. digestiva fueron tratados con 2-PAM o diluidos en tampón de extracción. Ver leyenda anterior.

Muestra		Sin Tratar	+50-veces diluc.	+1 mM 2-PAM
0 días	T0	16.11±1.72	13.76±1.90	11.87±2.25(*)
2 días Exp.	Control	11.02±2.45	9.44±2.43	8.48±1.32
	½ LC50	10.06±1.88	8.14±1.14	7.99±0.72
	LC50	17.21±1.78	14.3±1.45(*)	15.72±2.03
7 días Exp.	Control	14.38±1.69	11.27±1.29(*)	10.93±1.42(*)
	½ LC50	7.05±0.83(*)	5.62±1.00	5.36±1.09
	LC50	6.99±1.26(*)	5.67±1.19	6.32±1.10
7 días Rep.	Control	9.88±1.00	7.05±1.64(*)	8.63±1.04
	½ LC50	15.50±1.38(*)	12.24±1.34(*)	13.60±1.71
	LC50	7.67±1.35	6.63±1.21	8.16±1.59

Los resultados expuestos indican que, a diferencia de la reactivación de las enzimas inhibidas *in vitro* por OPs y CMs, AChE y CbE no se reactivan tras su tratamiento *in vivo*.

IV.2. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN *IN VIVO* A CLORPIRIFOS Y CARBARIL SOBRE BIOMARCADORES CONVENCIONALES DE CONTAMINACIÓN

En los cangrejos expuestos *in vivo* a plaguicidas, como se acaba de mostrar, se midieron también 8 biomarcadores convencionales de contaminación, relacionados con la biotransformación y el estrés oxidativo. La Fig 56 muestra la respuesta al clorpirifos de 4 de ellos. La actividad EROD (biotransformación, F I) disminuyó a los 2 días de exposición a baja dosis, permaneciendo menor que en animales sin tratar, a 7 días y tras retirar el plaguicida. Por contra, la GST (biotransformación, F II) aumentó a ambos tiempos, significativamente a los 2 días a dosis moderada, recobrando su valor inicial tras retirar el OP. La actividad CAT (antioxidante) tuvo un comportamiento raro: se inhibió totalmente a baja concentración a 2 y 7 días y permaneció baja tras retirar el OP, pero tuvo valores cercanos a los de los animales sin tratar a dosis moderada. El GSSG bajó de forma proporcional a la dosis a los 2 días, mientras que tras retirar el OP subió de nuevo, de forma significativa a dosis moderada. La Tabla 26 muestra las respuestas de otros 4 biomarcadores ensayados. A concentración moderada del OP

había valores bajos de GSH pero sin diferencias significativas. Los valores de MDA, la actividad GPx y los niveles de MTs no mostraban cambios apreciables.

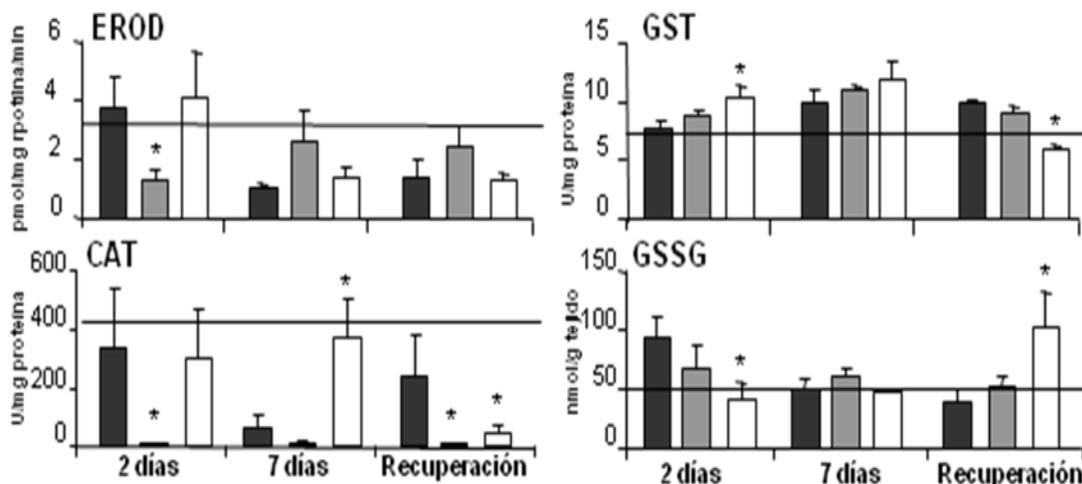


Fig. 56. *Respuesta de algunos biomarcadores convencionales en P. clarkii expuestos a clorpirifos.* En gl. digestiva de animales expuestos a concentración baja (■) y moderada (□) de clorpirifos durante 2 y 7 días, y 7 días tras retirar el plaguicida, se ensayaron los valores indicados frente al control correspondiente (■) y a los valores sin tratar (—), que fueron 3.1 ± 1.1 ; 7.08 ± 0.53 ; 420 ± 192 ; 50.6 ± 24.3 para EROD, GST, CAT y GSSG, respectivamente. Los datos se muestran como las medias \pm EE de 5 cangrejos. La significación estadística vs. su respectivo grupo control se muestra como * $p < 0.05$.

Tabla 26. *Respuesta de otros biomarcadores en P. clarkii expuestos a clorpirifos.* Igual leyenda que la figura anterior.

	T0	2 DÍAS			7 DÍAS			RECUPERACIÓN		
		control	baja	moderada	control	baja	moderada	control	baja	moderada
GSH	1404	1624	1706	1375	1543	1790	1193	1155	1588	1380
nmol/gr tejido	± 141	± 120	± 188	± 239	± 71.4	± 294	± 240	± 258	± 186	± 194
MDA	297	300	269	276	310	318	329	304,68	344	291
nmol/gr tejido	± 21.6	± 17.0	± 37.2	± 23.9	± 38.7	± 22.4	± 100	± 27.64	± 9.58	± 26.3
GPx	0.72	0.90	1.04	0.98	1.02	1.14	1.07	1.17	1.13	0.91
U/mg prot	± 0.13	± 0.13	± 0.14	± 0.20	± 0.10	± 0.09	± 0.06	± 0.12	± 0.11	± 0.07
MTs	21.8	19.9	19.6	20.4	23.5	22.4	21.7	22.4	20.8	23.0
nmol/mg prot	± 1.47	± 2.23	± 1.34	± 3.31	± 3.89	± 1.07	± 2.03	± 3.19	± 1.02	± 1.51

La Figura 57 y la Tabla 27 muestran la respuesta de los mismos biomarcadores convencionales a la exposición *in vivo* a carbaril. La actividad de las dos enzimas biotransformadoras aumentó significativamente, la actividad EROD solo a bajas concentraciones y la actividad GST a ambas concentraciones de CM, aunque en ninguno de los dos casos recobraron sus valores iniciales tras retirar el plaguicida. La actividad CAT aumentó de forma proporcional a la concentración de carbaril, aunque su aumento solo fue significativo a baja dosis tras retirar el plaguicida. La GPx se inhibió a dosis bajas, significativamente a los 7 días. Los niveles de GSH disminuyeron a ambas dosis a los 7 días de exposición, tanto en comparación con los animales sin

tratar como frente al control a dicho tiempo de exposición. La Tabla 27 muestra las respuestas de otros 3 biomarcadores ensayados. Los niveles de GSSG, MDA y MTs permanecieron inalterados en su mayoría, aunque se observaban ciertos aumentos de GSSG y MDA en respuesta a dosis moderadas de CM, aunque no significativas.

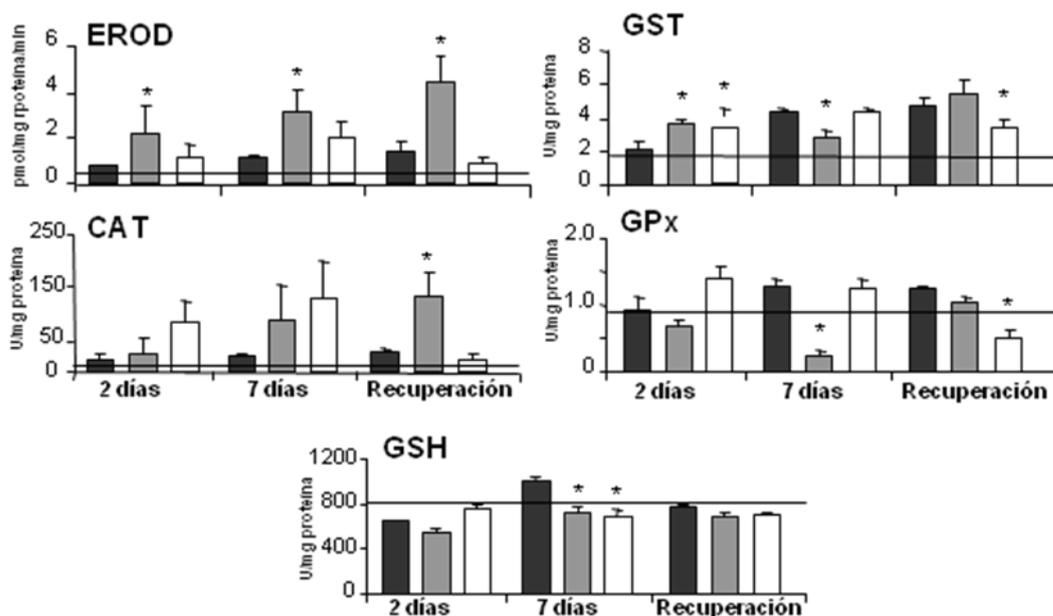


Fig. 57. *Respuesta de algunos biomarcadores convencionales en P. clarkii expuestos a carbaril.* En gl. digestiva de animales expuestos a concentración baja (■) y moderada (□) de carbaril durante 2 y 7 días, y 7 días tras retirar el plaguicida, se ensayaron los valores indicados frente al control correspondiente (■) y a los valores sin tratar (—), que fueron 0.47 ± 0.18 ; 1.93 ± 0.49 ; 12.2 ± 4.13 ; 0.87 ± 0.18 ; 806 ± 86.6 para EROD, GST, CAT y GSSG, respectivamente. Los datos se muestran como las medias \pm EE de 5 cangrejos. La significación estadística vs. su respectivo grupo control se muestra como $s^* p < 0.05$.

Tabla 27. *Respuesta de otros biomarcadores en P. clarkii expuestos a carbaril.* Igual leyenda que la figura anterior.

	T0	2 DÍAS			7 DÍAS			RECUPERACIÓN		
		control	baja	moderada	control	baja	moderada	control	baja	moderada
GSSG	87.6	59.3	70.5	85.0	98.5	69.3	141	82.9	82.1	106
nmol/gr tejido	± 11.7	± 10.9	± 10.9	± 18.8	± 18.7	± 4.05	± 27.7	± 25.0	± 10.8	± 15.6
MDA	1065	666	498	1468	1296	672	1237	767	411	579
nmol/gr tejido	± 613	± 176	± 187	± 844	± 378	± 402	± 759	± 363	± 30.9	± 151
MTs	22.1	21.4	22.0	27.2	24.9	24.5	20.1	21.3	25.5	21.1
nmol/mg prot	± 0.82	± 1.63	± 1.23	± 2.15	± 1.72	± 2.34	± 4.93	± 3.06	± 3.71	± 2.76

IV.3. ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA EN *P. CLARKII* EXPUESTOS A CLORPIRIFOS Y CARBARIL

Tras optimizar las condiciones para la extracción proteica y el análisis 2-DE, procedimos a analizar las señales de expresión proteica (PES) en branquias y tejido nervioso. La alteración de las PES se analizó en los cangrejos expuestos 7 días a plaguicida. Se hicieron 4 réplicas de cada condición: control, baja dosis y dosis moderada.

La Fig. 58 muestra geles 2-DE representativos de los proteomas solubles de branquias (A) y tejido nervioso (B). Estos dos proteomas tienen 2000 y 2100 manchas bien resueltas, respectivamente, correspondientes a proteínas de pI entre 4 y 7 y de 14-150 kDa. Ambos tejidos tuvieron un patrón muy diferente, especialmente en las áreas marcadas con números romanos, I, II y III, que ilustran las diferencias entre estos dos órganos de funciones tan distintas. Tras la exposición a plaguicida, 107 manchas tuvieron diferencias de intensidad significativas ($p < 0.001$). Dichas manchas se indican en la figura numeradas junto a símbolos redondos, para las alteradas en respuesta a concentración baja y moderada de clorpirifos, o junto a triángulos, para las alteradas en respuesta a concentraciones baja y moderada de carbaril.

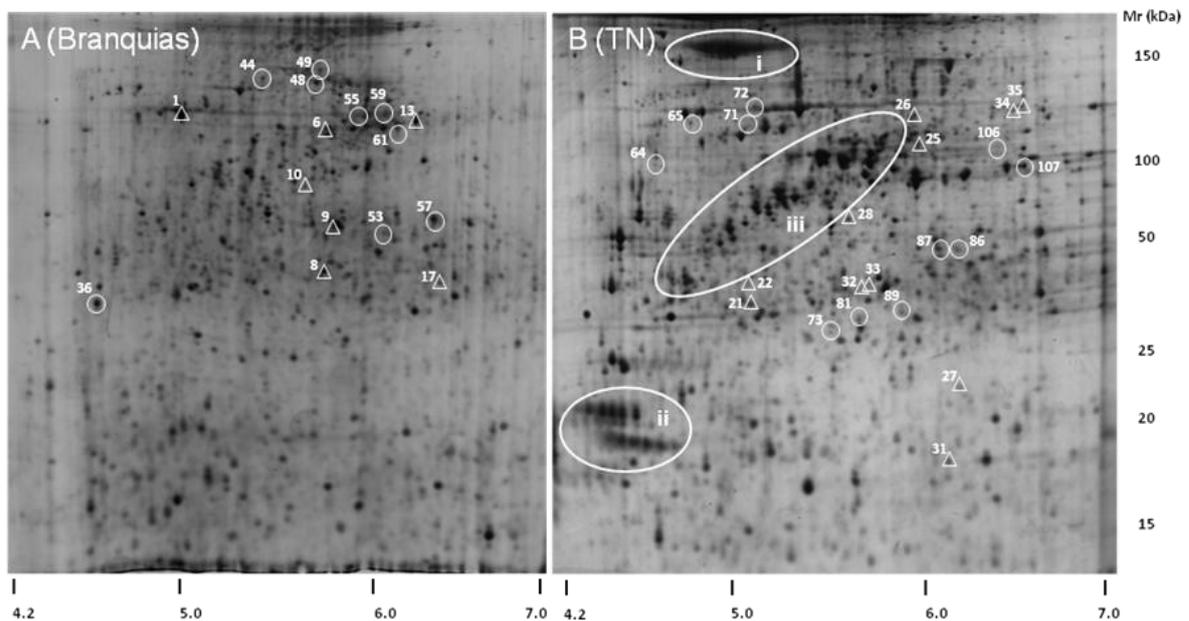


Fig. 58. *Geles 2-DE representativos del proteoma citosólico de branquias (A) y tejido nervioso (B) de *P. clarki*.* Los símbolos indican las manchas que mostraron diferencias significativas de intensidad ($p < 0.001$) tras la exposición durante 7 días a dosis baja y moderada de clorpirifos (O) o carbaril (Δ). Las áreas marcadas como : i), ii) and iii) diferencian claramente el patrón del proteoma de tejido nervioso del encontrado en branquias.

La Tabla 28 recoge las 35 proteínas que por mostrar los mayores cambios de intensidad, fueron seleccionadas como señales de expresión proteica específicas para cada tratamiento y tejido. En cangrejos expuestos a clorpirifos se seleccionaron nueve

manchas (**36, 44, 48, 49, 53, 55, 57, 59 y 61**) como señal de expresión proteica específico de branquias y otras once (**64, 65, 71, 72, 73, 81, 86, 87, 89, 106 y 107**) en tejido nervioso. La señal de expresión proteica específica de carbaril incluía otras siete manchas completamente diferentes en branquias (**1, 6, 8, 9, 10, 13, y 17**) y otras once totalmente distintas de las anteriores (**21, 22, 25, 26, 27, 28, 31, 32, 33, 34 y 35**) en tejido nervio.

Tabla 28. *Manchas seleccionadas en P. clarkii como PES de exposición a clorpirifos o carbaril.* Los numerosos corresponden a los indicados en la Fig. 54. A/B.

Plaguicida	Branquias	Tejido Nervioso
	36, 44, 48, 49,	64, 65, 71, 72, 73,
Clorpirifos	53, 55, 57, 59, 61 (<i>N</i> = 9)	81, 86, 87, 89, 106, 107 (<i>N</i> = 11)
	1, 6, 8, 9, 10, 13, 17 (<i>N</i> = 7)	21, 22, 25, 26, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35 (<i>N</i> = 11)
Carbaril		

La Tabla 29 recoge el número de proteínas sobreexpresadas o subexpresadas en cada órgano, frente al control no expuesto, a los 7 días de exposición con cada plaguicida. Dos tercios de las proteínas, 72 de 107, fueron significativamente alteradas por clorpirifos, cuyo efecto dominó en el tejido nervioso, donde 45 proteínas fueron alteradas frente a solo 27 proteínas alteradas en branquias. El otro tercio de las proteínas, 35, fueron alteradas por carbaril, aunque sus efectos fueron similares en ambos tejidos, 17 en tejido nervioso y 18 en branquias. La mayoría de las proteínas alteradas, 67, fueron sobreexpresadas, 46 por clorpirifos y 21 por carbaril. Las 40 manchas restantes disminuyeron su expresión, 26 en respuesta a clorpirifos y otras 14 por efecto del carbaril. De las 107 manchas alteradas, solo 23 sufrieron cambios cualitativos, es decir, estaban presentes en una condición (control, dosis baja o moderada) pero ausente en otra o en las otras dos condiciones. La mayoría de los cambios, 84 de 107, fueron cuantitativos, es decir, manchas con diferencias de intensidad de más de 3 veces; estos cambios fueron en su mayoría por sobreexpresión en comparación con el control sin tratar.

Tabla 29. *Número de manchas con diferencias de intensidad significativas en P. clarkii tras 7 días de exposición a clorpirifos o carbaril*

Plaguicida	Efecto de Expression	Órgano/Tejido		N° Parcial	N° Total
		Branquias	Tejido Nervioso		
Clorpirifos	+	22	24	46	72
	-	(27)	(45)	26	
Carbaril	+	8	13	21	35
	-	(18)	(17)	14	
					107

La Figura 59 muestra vistas ampliadas recortadas de los geles originales mostrando en detalle las proteínas que mostraban las mayores diferencias de intensidad en los geles de branquias y tejido nervioso a los 7 días de exposición a baja o moderada dosis respecto del control sin tratar. Los histogramas muestran la intensidad de las manchas en cada condición, su patrón de variación y el número de veces de diferencia, y su clasificación en seis tipos de categorías tanto cualitativos como cuantitativos. De las veinte incluidas en la figura, nueve manchas eran alteradas en branquias y 11 en tejido nervioso. Diecinueve de las 20 diferencias mostradas en la figura correspondían a sobreexpresiones: tres de las manchas (**44**, **48** y **59**) variaban de forma proporcional a la dosis de exposición; otras nueve manchas (**49**, **55**, **57**, **61**, **64**, **65**, **71**, **72** y **87**) eran sobreexpresadas solo a baja dosis de clorpirifos y otras siete manchas (**36**, **53**, **73**, **82**, **89**, **106** y **107**) eran sobreexpresadas solo a dosis moderada de este plaguicida organofosforado. Solo tres de las veinte proteínas incluidas en la figura sufrieron descensos de expresión, dos de ellas (**73** y **82**) a baja concentración de plaguicida, y una mancha (**86**) resultó subexpresada a dosis moderada de este organofosforado.

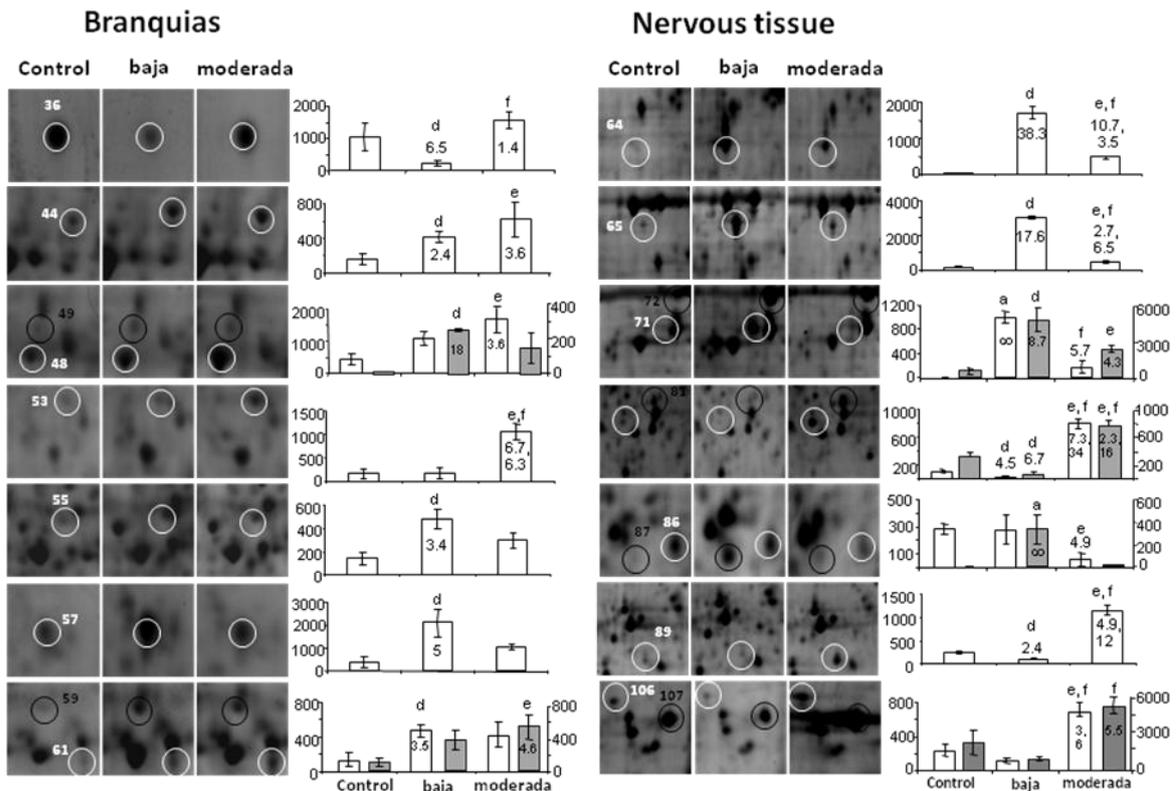


Fig. 59. *Proteínas con máximas alteraciones de intensidad en branquias y tejido nervioso de P. clarkii tras 7 días de exposición a clorpirifos.* Las diferencias de significación estadística ($p < 0.001$) tras 7 días de exposición a clorpirifos se muestran como: Cualitativas, **a** control vs dosis baja, y **c** dosis baja vs. moderada. Cuantitativas, **d** control vs. dosis baja, **e** control vs. dosis moderada, y **f** dosis baja vs. moderada.

Un análisis parecido se realizó también en branquias y tejido nervioso tras la exposición *in vivo* de los cangrejos a carbaril durante 7 días (Fig. 60). Siete de las 18 proteínas que mostraban las mayores diferencias de intensidad resultaron alteradas en branquias y otras 11 en tejido nervioso. Conviene señalar que estas han sido las manchas seleccionadas en la Tabla 28 como PES específicas de la exposición a carbaril en los dos tejidos indicados. En comparación con el control no expuesto, doce de las manchas (**9, 10, 13, 21, 25, 26, 28, 31, 32, 33, 34** y **35**) resultaron sobrepresadas y las restante seis manchas (**1, 6, 8, 17, 22** y **27**) tuvieron bajadas de intensidad. Seis de las manchas incluidas en la figura (**13, 25, 26, 31, 32** y **33**) estaban sobrepresadas y una mancha (**27**) disminuyó su expresión de forma directamente proporcional a la dosis de exposición. Otras diez manchas resultaron sobrepresadas (**9, 10, 28, 34** y **35**) o subexpresadas (**1, 6, 8, 17** y **22**) sólo tras la exposición a baja concentración de carbaril. Por último, otras cinco manchas resultaron sobrepresadas (**6** y **10**) o subexpresadas (**8, 21** y **34**) sólo tras la exposición a concentraciones moderadas de carbaril.

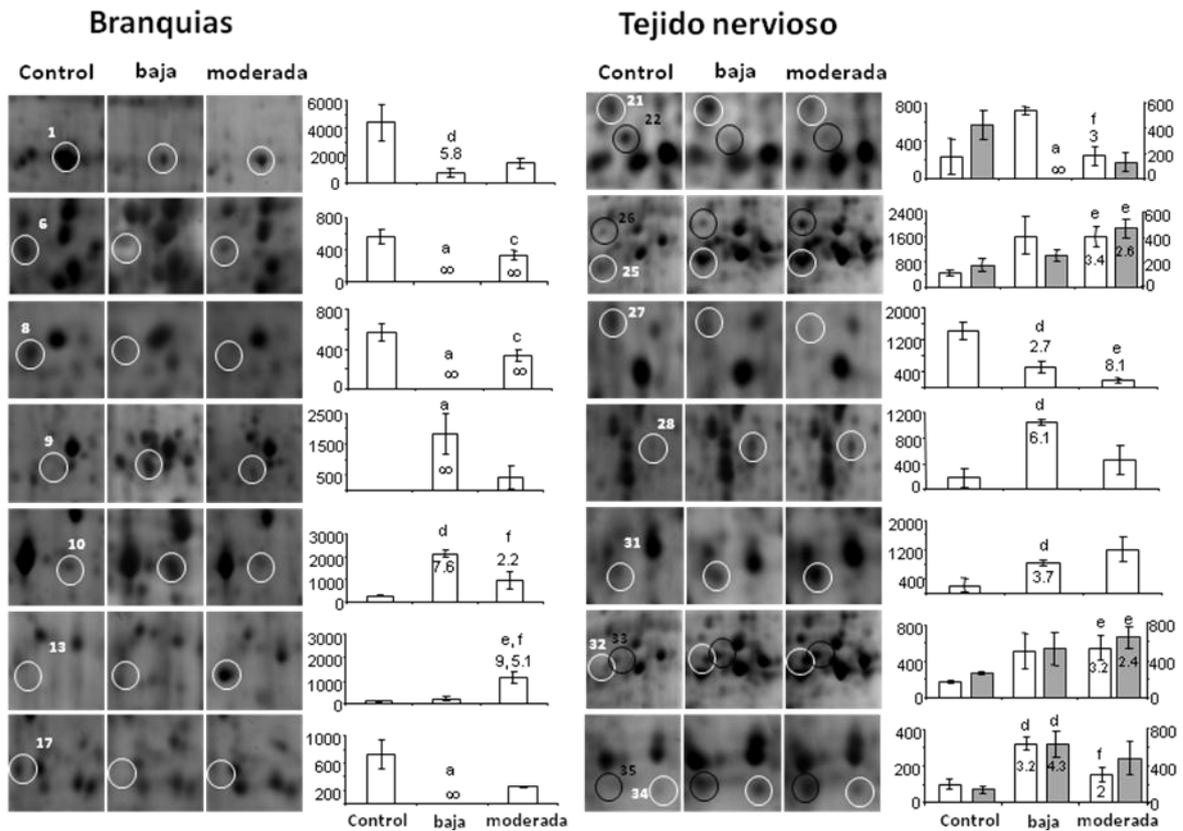


Fig. 60. *Proteínas con máximas alteraciones de intensidad en branquias y tejido nervioso de P. clarkii tras 7 días de exposición a carbaril.* Las diferencias de significación estadística ($p < 0.001$) tras 7 días de exposición a carbaril se muestran como: Cualitativas, **a** control vs. dosis baja, **b** control vs. dosis moderada y **c** dosis baja vs. moderada. Cuantitativas, **d** control vs. dosis baja, **e** control vs. dosis moderada, y **f** dosis baja vs. moderada.

Los resultados que se acaban de mostrar en las dos últimas figuras confirman la validez como señales de expresión protéica específicas de la exposición a clorpirifos o carbaril de las 35 proteínas que habían sido seleccionadas tras los análisis proteómicos llevados a cabo en cangrejos expuestos *in vivo* a estos dos plaguicidas escogidos como modelo.

V. ANÁLISIS DE LA CONTAMINACIÓN DEL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA EN P. CLARKII: INTEGRACIÓN DE LAS RESPUESTAS DE UNA BATERÍA DE BIOMARCADORES CONVENCIONALES Y DE LA APROXIMACIÓN PROTEÓMICA.

V.1. NIVELES DE PLAGUICIDAS Y METALES EN EL PND

El grupo del profesor Gómez-Ariza, de la Universidad de Huelva, midió los niveles de diferentes tipos de contaminantes, en muestras de agua y suelo tomadas de mismos lugares donde se habían capturado cangrejos. La Tabla 30 muestra los resultados del análisis de 22 plaguicidas. En sitios considerados de referencia, LD y LDP, no se detectaron plaguicidas en agua de LD y solo se detectó pendimetalin in agua de LDP. Además, mientras en suelo de LDP no se detectó ningún plaguicida, el suelo de LD tuvo altos contenidos de trifluralina y α -cipermetrin y bajos niveles de DDT, bromopropilato y acrinatrin. En cambio, se hallaron varios tipos de plaguicidas en agua y/o suelo de las areas de cultivo de arroz, junto al Guadiamar, VIL y sobre todo MAT. Entre ellos se detectaron altos niveles de malation, niveles moderados de diclofuanido, bupirimato, bromacilo y dimetoato y niveles menores de DDT, clorpirifos, metidation, bromopropilato, trifluralina, captafol, acrinatrina y penconazol. Algunos compuestos fueron encontrados también en niveles moderados en agua (pero no en suelo) en el curso bajo de la "Rocina", como en el sitio BER, y el curso alto del "Partido", como en el sitio PAR, y en niveles mas bajos en el sitio AJO, pero no en el curso alto de la "Rocina", ROC, donde solo se encontró un isómero de PCB.

También se analizaron diversos metales (Mn, As, Zn, Cr, Ni, Cu, Pb, Co, Cd, Mo) en las mismas muestras de suelo donde se habían medido los plaguicidas. La Tabla 30 muestra asimismo la concentración total de metales. Altos niveles de Mn, Zn, Cr, Ni y Co se detectaron en los arrozales, en los sitios VIL y MAT, cercanos al Guadiamar. En las otras zonas problema, ubicadas en los arroyos "Rocina" y "Partido", y en las dos zonas de referencia, LD y LDP, se encontraron niveles más bajos de metales. Altos niveles de As fueron detectados en suelos de MAT y LD, 221 y 154 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, aunque en el resto de zonas los niveles de As estaban por debajo de los niveles de detección de la técnica. El porcentaje de arena en la muestras de suelo también se incluye en esta tabla. Se encontró correlación significativa entre la proporción de arena y el contenido de metales total del suelo: altos contenidos de metales fueron detectados en suelos con bajo % de arena, como VIL y MAT, y niveles bajos de metales fueron típicos de suelos arenosos, como ROC, BER, LD y LDP, esta relación inversa tuvo un coeficiente de correlación de 0.865 y un valor *P* de 0.0269.

Resultados

Tabla 30. *Concentración de plaguicidas y metales en aguas y suelos del PND en la primavera de 2004.*

zona	Plaguicida (tipo) ^a	Agua $x \pm \sigma$ (ng l ⁻¹)	Suelo $x \pm \sigma$ (µg g ⁻¹)	Σ Metals (µg g ⁻¹) ^b	Arena (%)
OC	PCB138 (OCI)	1.8±0.2	nd ^c	389.3	82.3
	Dimetoato (CB)	101.0±14.0	nd	491.4	91.1
BER	Bromacilo (OBr)	210.0±27.0	nd		
	AR	Molinato (OP)	11.4±1.3	nd	635.3
4,4'-DDD (OCID)		24.5±2.9	nd		
Diclofuanido (SFM)		15.2±2.3	nd		
Folpet (PHT)		14.3±1.6	nd		
AJO	Molinato (OP)	7.3±1.1	nd	567.4	22.4
VIL	4,4'-DDT (OCI)	nd	19.0±3.0	1243.5	12.3
	Diclofuanido (SFM)	nd	410.0±40.0		
	Bupirimato (Pyr)	nd	298.1±36.0		
MAT	Malation (OP)	1099.0±27.0	nd	1188.2	28.5
	Clorpirifos (OP)	57.0±8.0	nd		
	Me-clorpirifos (OPD)	nd	4.5±0.5		
	Metidation (OP)	15.0±2.0	nd		
	Dimetoato (CB)	196.0±31.0	nd		
	4,4'-DDT (OCI)	nd	30.0±4.0		
	Bromacilo (OBr)	210.0±25.0	nd		
	Bromopropilato (OBr)	10.6±1.2	nd		
	Trifluoralina (OFI)	25.0±4.0	nd		
	Captafol (PHT)	10.6±14.0	nd		
	Acrinatrina (PTR)	76.0±13.0	nd		
	Penconazol (TRZ)	16.0±2.0	nd		
	LD	PCB52 (OCI)	nd		
4,4'-DDT (OCI)		nd	4.5±0.6		
Bromopropilato (OBr)		nd	49.0±5.0		
Trifluoralina (OFI)		nd	2094.0±53.0		
Acrinatrina (PTR)		nd	42.0±5.0		
α-Cipermetrina (PTR)		nd	1688.0±47.0		
LDP	Pendimetalina (TRZ)	226.0±31	nd	378.3	79.2

^a Los tipos de plaguicida se muestran como: OCI(D), organoclorados (derivados); CB, carbamato; OBr, organobromados; OP(D), organofosfatos (derivado); SFM, sulfamida; PHT, phtalamide; PTR, piretroides; TRZ, triazol.

^b Concentración total de Mo, Zn, Pb, Cd, Co, Ni, Mn, Cr, Cu y As.
nd: no detectado.

V.2. RESPUESTA DE LAS ESTERASAS DE CANGREJOS DEL PND

Los ensayos de CbE, en glándula digestiva, y de AChE, en tejido nervioso, fueron adaptados a *P. clarkii* y utilizados como biomarcadores de exposición a plaguicida. La reactivación que había sido previamente propuesta para distinguir exposición a CM o OP (Vioque-Fernández et al, 2007a) fue también usada en los ensayos de muestras de las distintas zonas del Parque Nacional de Doñana.

La Fig 61 muestra los resultados de las actividades AChE y CbE ensayados en primavera 2003 en cangrejos de dos zonas de referencia y seis zonas problema del PND. En general, ambas actividades esterasas fueron mayores en cangrejos de las zonas de referencia, LD y LDP, que aquellos muestrados en las zonas potencialmente contaminadas (Vioque-Fernández et al., 2007b).

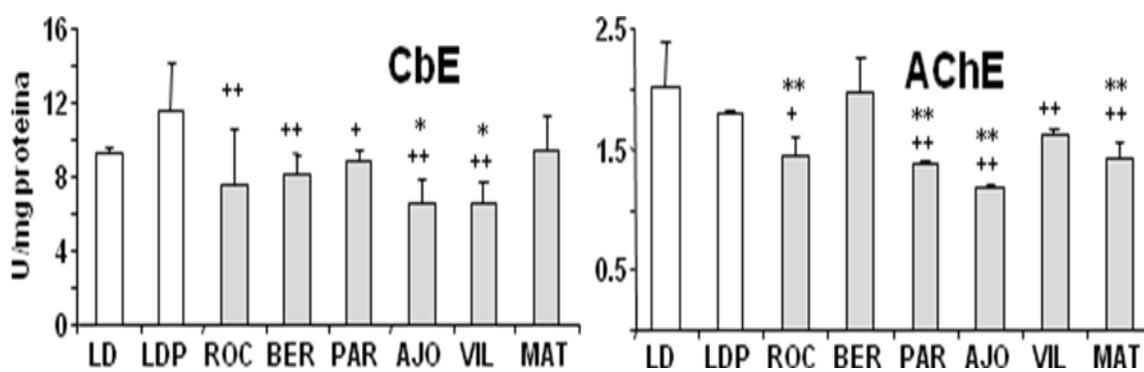


Fig. 61. *Esterasas analizadas en primavera 2003.* Los datos muestran las medias \pm SE de las actividades de ocho cangrejos. La significación estadística, comparada con LD (*) y LDP (+), se evaluó con el test Dunnett y se expresa como: */+ $P < 0.5$, **/+ $P < 0.01$ y ***/+++ $P < 0.001$.

Los animales de 5 zonas potencialmente contaminadas de Doñana, ROC, BER, PAR, AJO y VIL, tuvieron una actividad CbE significativamente menor, entre 43% y 23%, que los de la zona de referencia LDP. En cambio, no se vieron diferencias significativas en los cangrejos de MAT, potencialmente contaminada. Puesto que la CbE estaba inhibida en 5 de las 6 zonas contaminadas, estos animales podrían haber estado expuestos a OPs o CMs. La AChE de cangrejos de 4 zonas potencialmente contaminadas por plaguicidas, ROC, PAR, AJO y MAT, fue significativamente menor, entre 34% y 20%, que los de la zona de referencia LDP, aunque no se vieron diferencias significativas en los de otras 2 zonas afectadas, BER y VIL. Los animales muestreados en la zona de referencia, LD, tuvieron 11% más actividad en la otra, LDP, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa. Aunque la inhibición de la AChE fue menor que la de CbE, la baja actividad AChE de los cangrejos de 4 de las 6 zonas problema confirma que dichos cangrejos podrían estar expuestos a plaguicidas.

La posible reactivación de las actividades esterasas se estudió para distinguir los plaguicidas a que podrían haber estado expuestos. La Tabla 31 muestra la CbE sin

tratar, diluida o tratada con 2-PAM. No se encontraron diferencias significativas entre los extractos no tratados y los los diluidos 50 veces o tratados con 2-PAM, indicando que la CbE fue inhibida irreversiblemente. De forma similar, la actividad AChE tampoco recuperó actividad alguna tras una dilución de 30 veces ni el tratamiento de los extractos con 2-PAM (Tabla 32).

Tabla 31. *Extractos de glándula digestiva diluidos o tratados con 2-PAM.* Actividad CbE de *P. clarkii* muestreados en la primavera 2003 en varios puntos del PND.

Zona	+dilución 50 U/mg±SE ¹	% sin tratar	+1 mM 2-PAM U/mg±SE ¹	% sin tratar
ROC	6.5 ± 0.8 (ns)	81	6.9 ± 0.8 (ns)	86
BER	9.1 ± 0.6 (ns)	105	7.5 ± 1.4 (ns)	87
PAR	9.5 ± 0.2 (ns)	100	9.8 ± 0.1 (ns)	104
AJO	6.8 ± 0.5 (ns)	98	7.2 ± 0.6 (ns)	102
VIL	7.4 ± 0.5 (ns)	106	7.1 ± 0.6 (ns)	102
MAT	9.2 ± 0.3 (ns)	91	9.8 ± 0.4 (ns)	97
LD	9.5 ± 0.1 (ns)	96	9.9 ± 0.2 (ns)	100
LDP	14.6 ± 0.8 (ns)	118	13,4 ± 0.2 (ns)	109

¹ Significación estadística vs. a los resultados del mismo sitio sin tratar (recogidos en la Fig. 57), usando el test Bonferroni.

Tabla 32. *Extractos de tejido nervioso diluidos o tratados con 2-PAM.* Actividad AChE de *P. clarkii* muestreados en la primavera 2003 en varios puntos del PND.

Zona	+ dilución 30 U/mg±SE ¹	% sin tratar	+0.5 mM 2-PAM U/mg±SE ¹	% sin tratar
ROC	1.4 ± 0.05 (ns)	105	1.5 ± 0.05 (ns)	114
BER	2.03 ± 0.13 (ns)	113	1.99 ± 0.10 (ns)	110
PAR	1.26 ± 0.01 (ns)	99	1.39 ± 0.01 (ns)	110
AJO	1.19 ± 0.01 (ns)	108	1.29 ± 0.01 (ns)	118
VIL	1.67 ± 0.01 (ns)	112	1.63 ± 0.01 (ns)	109
MAT	1.40 ± 0.09 (ns)	108	1.42 ± 0.05 (ns)	109
LD	1.94 ± 0.12 (ns)	105	2.00 ± 0.08 (ns)	108
LDP	1.80 ± 0.07 (ns)	109	1.80 ± 0.01 (ns)	109

¹ Leyendas como en la tabla anterior.

Como en primavera de 2003, las actividades CbE y AChE también bajaron en otoño 2003 en los cangrejos procedentes de los arroyos “Rocina” y “Partido”, mientras que los animales muestreados en los arrozales, en los sitios VIL y MAT, tuvieron mayores actividades AChE y CbE, siendo significativa la diferencia de CbE en MAT (Fig 62).

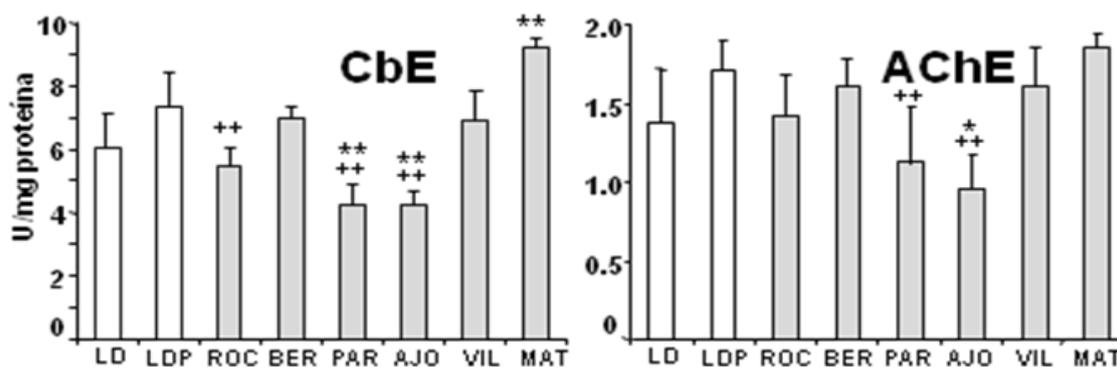


Fig. 62. *Esterasas analizadas en otoño 2003*. Leyenda igual que el la fig. 61 (primavera 2003).

La posible reactivación de los extractos de la campaña de otoño de 2003 también se estudió para distinguir a qué plaguicidas podían haber estado expuestos los animales. Como se había mostrado en la anterior campaña, tanto la actividad CbE (Tabla 33) como la AChE (Tabla 34) fueron inhibidas irreversiblemente, puesto que no se encontraron diferencias significativas entre los extractos no tratados y los diluidos 50 veces (30 veces en el caso de la AChE) o tratados con 2-PAM.

Esto confirmaba la idea de que las esterasas analizadas habían estado expuestas a plaguicidas durante un tiempo lo bastante largo como para que hubiese tenido lugar el proceso de envejecimiento, de forma que ya no podían ser reactivadas por ninguno de los dos tratamiento ensayados.

Tabla 33. *Extractos de glándula digestiva diluidos o tratados con 2-PAM*. Actividad CbE de *P. clarkii* muestreados en otoño de 2003 en varios puntos del PND.

Zona	+dilución 50 U/mg±SE ¹	% sin tratar	+1 mM 2-PAM U/mg±SE ¹	% sin tartar
ROC	5,02±0.209	90,94	5,78±0.116	104,71
BER	6,40±0.128(**)	91,17	6,20±0.179(*)	88,32
PAR	4,05±0.194	95,07	4,22±0.261	99,06
AJO	4,31±0.256	102,13	4,32±0.207	102,37
VIL	6,17±0.268	89,16	6,85±0.272	98,99
MAT	8,71±0.336	94,37	8,69±0.404	94,15
LD	5,91±0.355	97,69	6,03±0.401	99,67
LDP	6,92±0.194	94,02	7,30±0.463	99,18

¹ Significación estadística vs. a los resultados del mismo sitio sin tartar (Fig. 58), usando el test Bonferroni

Tabla 34. *Extractos de tejido nervioso diluidos o tratados con 2-PAM*. Actividad AChE de *P. clarkii* muestreados en otoño de 2003 en varios puntos del PND.

Zona	+ dilución 30 U/mg±SE ²	% sin tratar	+0.5 mM 2-PAM U/mg±SE ²	% sin tartar
ROC	1.67 ± 0.084 (ns)	117,78	1.268± 0.150 (ns)	89,38
BER	1.76 ± 0.48 (ns)	109,04	1.73 ± 0.028 (ns)	107,40
PAR	1.125 ± 0.118 (ns)	99,81	1.043 ± 0.059 (ns)	92,45
AJO	0.945 ± 0.077(ns)	99,86	0.963 ± 0.089 (ns)	101,89
VIL	1.79 ± 0.067 (ns)	111,34	1.802 ± 0.0629 (ns)	112,26
MAT	1.80 ± 0.34 (ns)	97,06	1.788 ± 0.043 (ns)	96,63
LD	1.54 ± 0.111 (ns)	111,70	1.605 ± 0.118 (ns)	116,14
LDP	1.89 ± 0.70 (ns)	110,26	1.76 ± 0.050 (ns)	102,64

¹Leyendas como en la tabla anterior.

La Fig 63 muestra las actividades AChE y CbE obtenidas en los cangrejos muestrados en primavera de 2004 en los puntos anteriormente descritos del Parque Nacional de Doñana. Como en las dos campañas anteriores, ambas esterasas fueron significativamente menores en los animales muestrados en las seis zonas problema, ROC, BER, PAR, AJO, VIL y MAT, en comparación con los cangrejos procedentes de las dos zonas de referencia, LD y LDP. Conviene señalar que en esta campaña las diferencias eran significativas cuando se comparaban con las dos zonas de referencia.

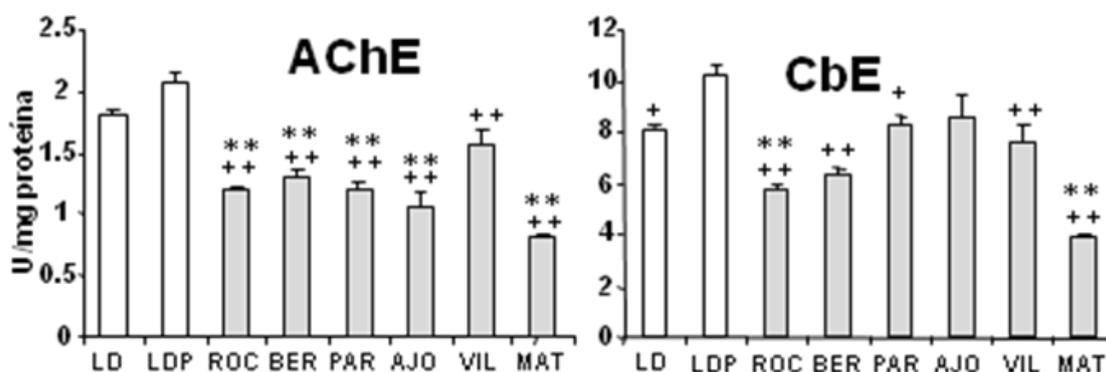


Fig. 63. *Esterasas analizadas en primavera 2004*. Leyenda como en la figura 61.

Al igual que habíamos comprobado en las dos campañas anteriores en el año 2003, tampoco pudo detectarse reactivación alguna en primavera de 2004 ni en la CbE (Tabla 35) ni en la AChE (Tabla 36) por dilución de los extractos o por tratamiento con 2-PAM, confirmando su irreversibilidad y por ello su posible envejecimiento tras la inhibición inicial por los plaguicidas OPs y CMs existentes en la zona.

Tabla 35. *Extractos de glándula digestiva diluidos o tratados con 2-PAM*. Actividad CbE de *P. clarkii* muestrados en primavera de 2004 en varios puntos del PND.

Zona	+dilución 50 U/mg±SE ¹	% sin tratar	+1 mM 2-PAM U/mg±SE ¹	% sin tartar
ROC	5,839±0.188	100,51	5,905±0.1312	101,64
BER	6,334±0.0750	99,66	6,868±0.1218	108,06
PAR	7,796±0.3684	93,71	8,407±0.287	101,06
AJO	7,872±0.851	91,93	8,264±0.835	96,52
VIL	7,122±0.577	93,03	8,112±0.496	105,95
MAT	4,753±0.503	120,32	4,101±0.1318	103,82
LD	7,129±0.166(**)	88,22	9,087±0.157(**)	112,44
LDP	9,851±0.120	96,64	10,537±0.1741	103,36

¹ Significación estadística vs. a los resultados del mismo sitio sin tartar (Fig. 59), usando el test Bonferroni

Tabla 36. *Extractos de tejido nervioso diluidos o tratados con 2-PAM.* Actividad AChE de *P. clarkii* muestreados en primavera de 2004 en varios puntos del PND.

Zona	+ dilución 30 U/mg±SE ²	% sin tratar	+0.5 mM 2-PAM U/mg±SE ²	% sin tartar
ROC	1.198± 0.037 (ns)	100,49	1.211± 0.026 (ns)	101,60
BER	1.297 ± 0.015 (ns)	99,67	1.404 ± 0.024 (ns)	107,87
PAR	1.089 ± 0.073 (ns)	91,23	1.211 ± 0.057 (ns)	101,48
AJO	0.904 ± 0.083(ns)	84,59	1.001 ± 0.089 (ns)	93,68
VIL	1.454 ± 0.115 (ns)	93,16	1.652 ± 0.099 (ns)	105,83
MAT	0.980 ± 0.100 (ns)	119,58	0.8502 ± 0.026 (ns)	103,68
LD	1.773± 0.076 (ns)	98,26	1.785 ± 0.057 (ns)	98,90
LDP	2.00 ± 0.024 (ns)	96,69	2.137 ± 0.035 (ns)	103,31

¹ Leyendas como en la tabla anterior.

Para finalizar el apartado referido al uso de las actividades esterasas como biomarcadores específicos de la exposición a plaguicidas, la Fig 64 muestra la respuesta de las dos actividades, AChE y CbE, obtenida en la campaña de muestreo llevada a cabo en otoño de 2004. En esta campaña no se pudieron muestrear cangrejos en la zona LD, por lo que LDP fue la única zona de referencia que pudimos usar. De nuevo, las actividades CbE y AChE diferenciaron claramente entre las zonas problema y de referencia, pues mostraban menores valores en la mayoría de las zonas probablemente contaminadas en comparación con las de referencia. Conviene señalar asimismo que, al igual que habíamos observado en otoño de 2003, de nuevo se detectaron aumentos significativos de actividad CbE, esta vez tanto en los animales procedentes de la zona PAR como de la zona MAT.

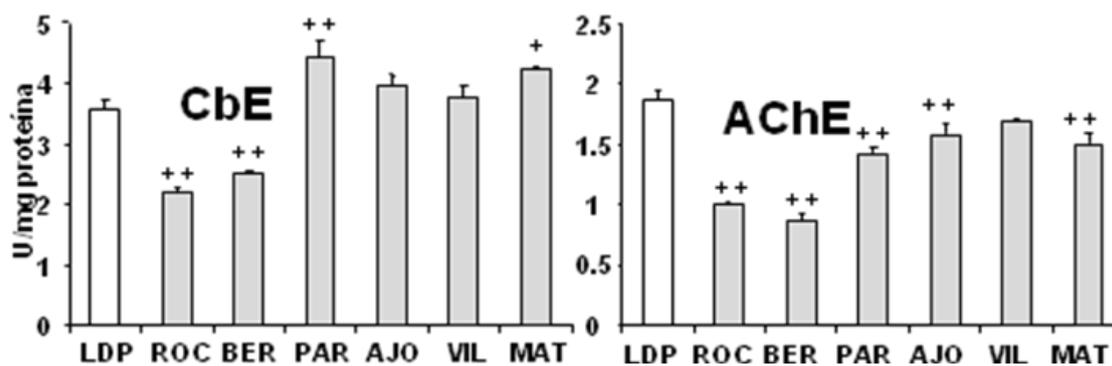


Fig. 64. *Esterasas analizadas en otoño 2004.* Leyenda como en la figura 61.

Tampoco fue posible atribuir la inhibición observada en las esterazas ensayadas a la exposición a OP o CM, pues ni la dilución ni el tratamiento con 2-PAM de extractos de glándula digestiva (Tabla 37) ó de tejido nervioso (Tabla 38) causaron efecto alguno en las actividades.

Tabla 37. *Extractos de glándula digestiva diluidos o tratados con 2-PAM.* Actividad CbE de *P. clarkii* muestreados en otoño de 2004 en varios puntos del PND.

Zona	+dilución 50 U/mg±SE ²	% sin tratar	+1 mM 2-PAM U/mg±SE ²	% sin tartar
ROC	3,142±0.050 (**)	143,90	2,155±0,271(ns)	98,68
BER	3,601±0.043(**)	143,79	2,610±0.259(ns)	104,23
PAR	4,135±0.188(ns)	92,90	3,004±0.333(**)	67,49
AJO	3,854±0.192(ns)	97,19	3,639±0.404(ns)	91,76
VIL	3,441±0.098(ns)	90,93	2,166±0.155(**)	57,23
MAT	4,094±0.069(ns)	96,29	3,806±0.163(*)	89,51
LDP	3,818±0.077 (ns)	106,44	4,578±0.094 (**)	127,62

¹ Significación estadística vs. a los resultados del mismo sitio sin tartar (Fig. 60), usando el test Bonferroni

Tabla 38. *Extractos de tejido nervioso diluidos o tratados con 2-PAM.* Actividad AChE de *P. clarkii* muestreados en otoño de 2004 en varios puntos del PND.

Zona	+ dilución 30 U/mg±SE ²	% sin tratar	+0.5 mM 2-PAM U/mg±SE ²	% sin tartar
ROC	1.107± 0.093 (ns)	110,50	1.237± 0.057(*)	123,46
BER	0.889 ± 0.101 (ns)	101,86	1.118 ± 0.036 (*)	128,02
PAR	1.447 ± 0.070(ns)	100,83	1.527 ± 0.031 (ns)	106,44
AJO	1.536 ± 0.140(ns)	96,85	1.596 ± 0.071 (ns)	100,62
VIL	1.626 ± 0.027 (ns)	95,58	1.694 ± 0.045 (ns)	99,62
MAT	1.436 ± 0.044 (ns)	94,87	1.516 ± 0.095 (ns)	100,15
LDP	1.744 ± 0.058 (ns)	92,83	1.833 ± 0.043 (ns)	97,57

¹ Leyendas como en la tabla anterior.

V.3. RESPUESTA DE OTROS BIOMARCADORES CONVENCIONALES EN CANGREJOS DEL PND

La Fig. 65 muestra la respuesta de 2 biomarcadores en cangrejos de 2 zonas de referencia y 6 problema en primavera de 2003. Las dos enzimas antioxidativas, KAT y G6PDH eran más activas en animales de referencia que de zonas problema. En cambio, otros 8 biomarcadores (Tabla 39) eran menos discriminantes. La actividad GLIOX fue significativamente menor en cangrejos del arroyo “Rocina”, y el nivel de MDA fue 5 veces menor en los del “Partido” y los arrozales. La alta actividad GST en animales de LD disminuyó significativamente en las otras áreas. Los otros parámetros, EROD, GSHPx, GSH, GSSG y MT, sólo mostraron pequeñas diferencias.

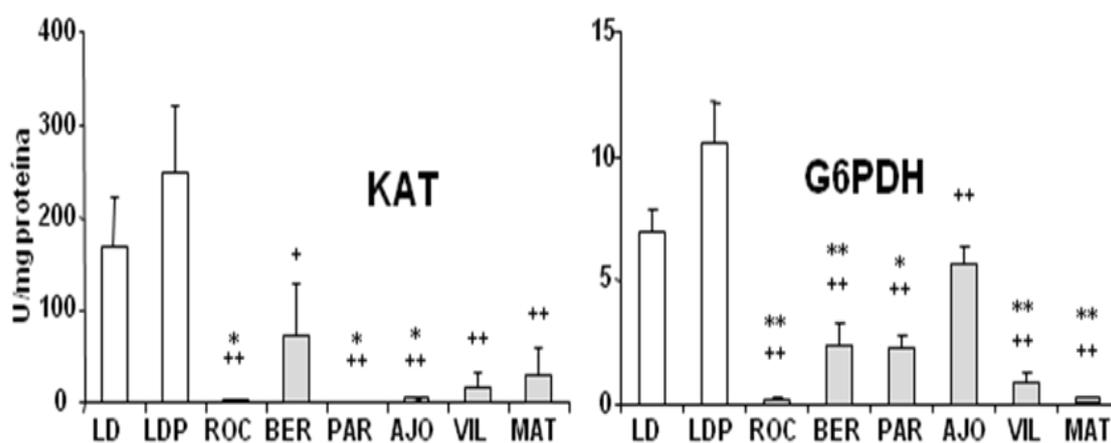


Fig. 65. *Biomarcadores con mayores diferencias en primavera 2003.* Los datos muestran las medias \pm SE de las actividades de 8 cangrejos. La significación estadística, comparada con LD (*) y LDP (+), se evaluó con el test Dunnett : */+ $P < 0.5$, **/+ $P < 0.01$ y ***/+++ $P < 0.001$.

Tabla 39. *Otros biomarcadores analizados en primavera 2003.* Leyenda como la fig. anterior.

Biomarcadores	Áreas de muestreo							
	LD	LDP	ROC	BER	PAR	AJO	VIL	MAT
GLYOX II (U/mg)	0.87 ± 0.13	0.91 ± 0.09	0.54+ ± 0.07	0.45**/+ ± 0.08	1.15 ± 0.15	0.57 ± 0.04	0.69 ± 0.03	0.66 ± 0.07
EROD (pmoles/min.mg)	1.74 ± 0.09	1.66 ± 0.06	2.13 ± 0.17	1.35 ± 0.17	1.15 ± 0.08	1.51 ± 0.08	1.92 ± 0.19	1.50 ± 0.06
GSTc (U/mg)	7.64++ ± 0.39	4.86** ± 0.25	3.84** ± 0.29	5.36** ± 0.52	4.61** ± 0.36	4.40** ± 0.29	5.44** ± 0.33	5.55** ± 0.33
GPx (U/mg)	1.60 ± 0.19	1.97 ± 0.14	1.50 ± 0.14	1.57 ± 0.17	2.35 ± 0.47	1.58 ± 0.14	1.38 ± 0.11	1.66 ± 0.22
GSH (nmol/g tejido)	49.9 ± 27.9	190 ± 51.2	151 ± 26.9	34.2 ± 6.96	171 ± 78.9	72.3 ± 22.9	426** ± 162	130 ± 42.5
GSSG (nmol/g tejido)	14.1 ± 2.29	19.4* ± 3.27	33.1 ± 3.51	22.2 ± 4.28	19.7 ± 5.90	21.2 ± 7.08	22.9 ± 2.73	21.0 ± 6.01
MDA (μ mol/g tejido)	2.96 ± 0.28	2.27 ± 0.72	2.14 ± 0.50	2.79 ± 0.42	0.25**/+ ± 0.01	0.40**/+ ± 0.03	0.37**/+ ± 0.03	0.45**/+ ± 0.03
MT (nmol/mg)	12.6 ± 1.84	12.3 ± 1.73	11.9 ± 1.33	10.6 ± 0.97	11.6 ± 1.16	14.9 ± 1.71	13.8 ± 1.73	11.6 ± 0.49

La Fig. 66 muestra la respuesta de 4 biomarcadores en otoño de 2003. La actividad KAT fue muy inferior en cangrejos de todas las zonas problema que en los de la zona de referencia LD. Los cangrejos de “La Rocina” tenían más MDA que los de LDP. Los niveles de GSH y GSSG fueron también muy distintivos: en VIL los cangrejos tenían bajo GSH/alto GSSG, mientras en MAT había alto GSH/bajo GSSG. Otros 6 biomarcadores (Tabla 40) G6PDH, GLYOX, EROD, GST, GPx y MT fueron menos discriminantes, aunque el alto nivel de MTs de cangrejos de LD convirtió en significativos los bajos valores del resto de las zonas.

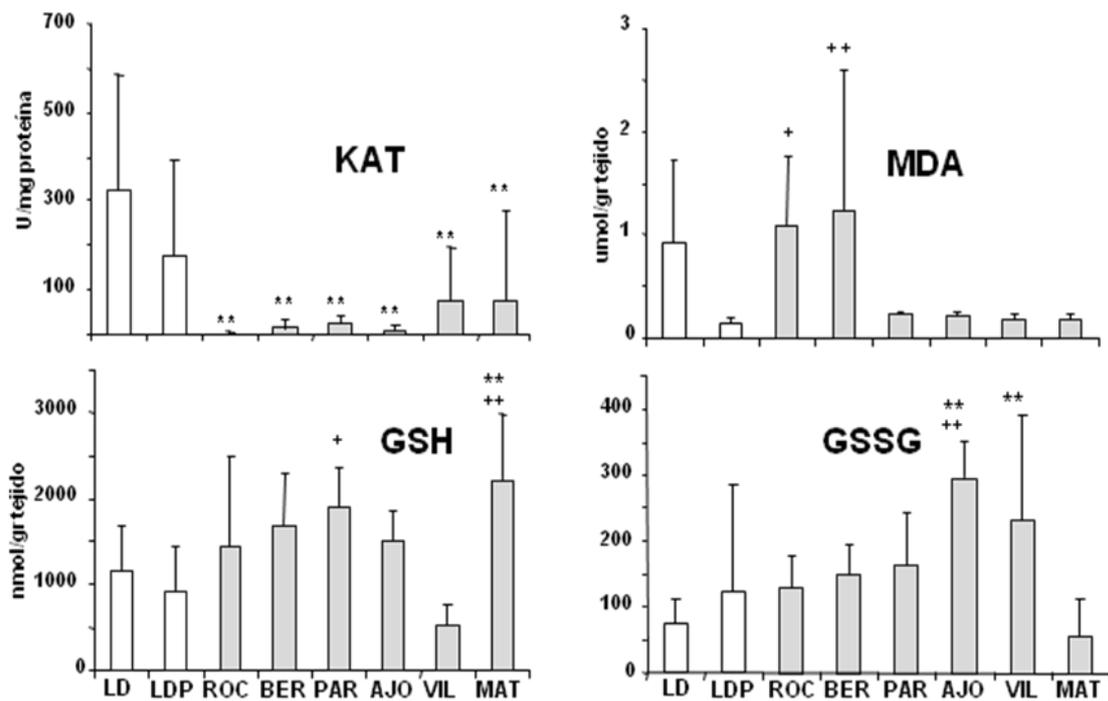


Fig. 66. *Biomarcadores más significativos en otoño 2003.* Leyenda como en la Fig. 65.

Tabla 40. *Otros biomarcadores analizados en otoño 2003.* Leyenda como en la Fig. 65.

Biomarcadores	Áreas de muestreo							
	LD	LDP	ROC	BER	PAR	AJO	VIL	MAT
G6PDH (mU/mg)	0.78 ±0.47	0.07 ±0.05	0.18 ±0.05	0.20 ±0.09	2.85 ±1.47	1.41 ±0.42	20.16**/++ ±8.98	9.53 ±7.08
GLYOX II (U/mg)	0.52 ±0.06	0.42 ±0.09	0.23* ±0.05	0.31 ±0.06	0.49 ±0.04	0.41 ±0.03	0.56 ±0.06	0.68 ±0.12
EROD (pmoles/min.mg)	1.26 ±0.11	2.66 ±0.54	1.4 ±0.13	1.57 ±0.18	1.30 ±0.07	1.99 ±0.11	4.25**/++ ±0.88	1.99 ±0.19
GSTc (U/mg)	3.23 ±0.43	3.37 ±0.43	2.01 ±0.21	2.61 ±0.28	3.53 ±0.21	2.99 ±0.33	3.42 ±0.39	4.24 ±0.51
GPx (U/mg)	1.31 ±0.21	1.37 ±0.24	1.20 ±0.19	2.19 ±0.15	3.33**/++ ±0.43	2.23 ±0.13	1.61 ±0.34	1.56 ±0.21
MT (nmol/mg)	9.47++ ±0.65	7.27** ±0.32	8.17 ±0.48	8.58 ±0.57	7.12** ±0.19	7.25** ±0.21	8.26 ±0.52	7.80 ±0.30

La Fig. 67 resume la respuesta de 4 biomarcadores en primavera de 2004. Como en campañas anteriores, la actividad KAT fue baja en cangrejos problema. El GSH fue bajo en "Partido" y los arrozales, mientras que el GSSG fue mayor en estos 4 sitios, sugiriendo un estrés oxidativo probablemente debido a metales. De hecho, las MTs fueron altas en muchas zonas problema. Otros 6 biomarcadores (Tabla 41) G6PDH, GLYOX, EROD, GST, GSHPx y MDA, mostraron mínimas diferencias.

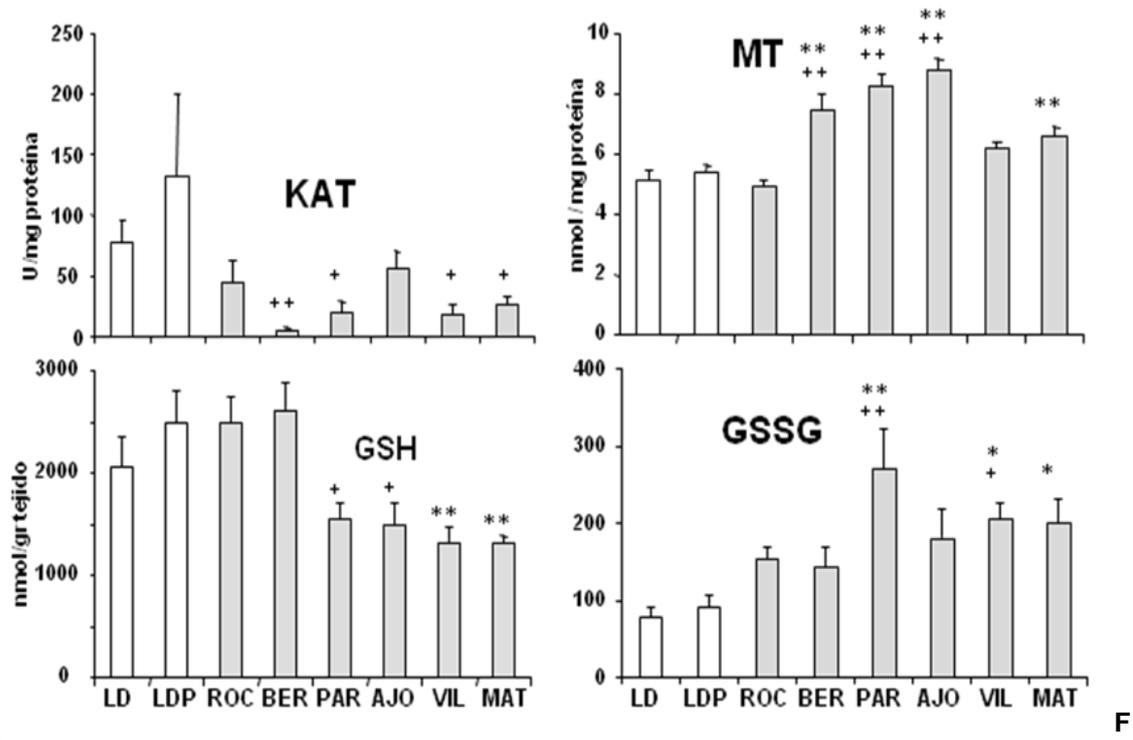


Fig. 67. Biomarcadores con mayores diferencias en primavera 2004. Leyenda como la Fig. 61.

Tabla 41. Otros biomarcadores analizados en primavera 2004. Leyenda como la Fig. 61.

Biomarker assayed	Areas sampled							
	LD	LDP	ROC	BER	PAR	AJO	VIL	MAT
G6PDH (mU/mg)	23.3 ±8.93	17.08 ±4.43	10.7 ±2.50	9.9 ±4.22	8.47 ±2.67	33.6 ±9.43	13.87 ±3.02	33.9 ±8.15
GLYOX II (U/mg)	0.76 ±0.09	0.86 ±0.19	0.43 ±0.04	0.5 ±0.09	0.7 ±0.10	0.68 ±0.10	0.78 ±0.11	0.53 ±0.04
EROD (pmoles/min.mg.)	0.73 ±0.06	0.75 ±0.12	0.46 ±0.03	0.53 ±0.09	0.82 ±0.18	0.93 ±0.32	0.38 ±0.03	0.69 ±0.19
GSTc (U/mg.)	10.9 ±1.38	12.6 ±2.06	7.9 ±0.92	6.61 ±0.96	11.2 ±0.58	10.2 ±1.33	12.6 ±1.52	11.7 ±1.10
GPx (U/mg.)	2.28 ±0.34	1.58 ±0.30	1.31 ±0.14	0.88 ±0.13	1.75 ±0.26	2.27 ±0.46	2.01 ±0.36	1.87 ±0.39
MDA (µmol/g. tejido)	1.11 ±0.26	0.20 ±0.01	1.90 ±0.39	0.88 ±0.24	0.39 ±0.02	0.70 ±0.28	0.25 ±0.04	0.25 ±0.05
EROD (pmoles/min.mg.)	0.73 ±0.06	0.75 ±0.12	0.46 ±0.03	0.53 ±0.09	0.82 ±0.18	0.93 ±0.32	0.38 ±0.03	0.69 ±0.19

La Fig 68 muestra la respuesta de 4 biomarcadores en otoño de 2004. El MDA fue alto en la “Rocina” (como en otoño de 2003) y el “Partido” pero no en arrozales. De nuevo GSH y GSSG diferenciaron las zonas problema y de referencia, aunque había altos niveles elevados de ambos en algunas áreas del “Partido” y los arrozales. Como en otoño 2003, los cangrejos de MAT tenían alto GSH y bajo GSSG. Las MTs eran altas en ciertos sitios problema (Partido y arrozales, como en primavera 2004), en paralelo a la respuesta de los biomarcadores de estrés oxidativo asociado la existencia de metales, MDA, GSSG y GP (Tabla 42). Los otros seis biomarcadores no mostraron diferencias significativas, incluido KAT, muy discriminativo en el resto de campañas.

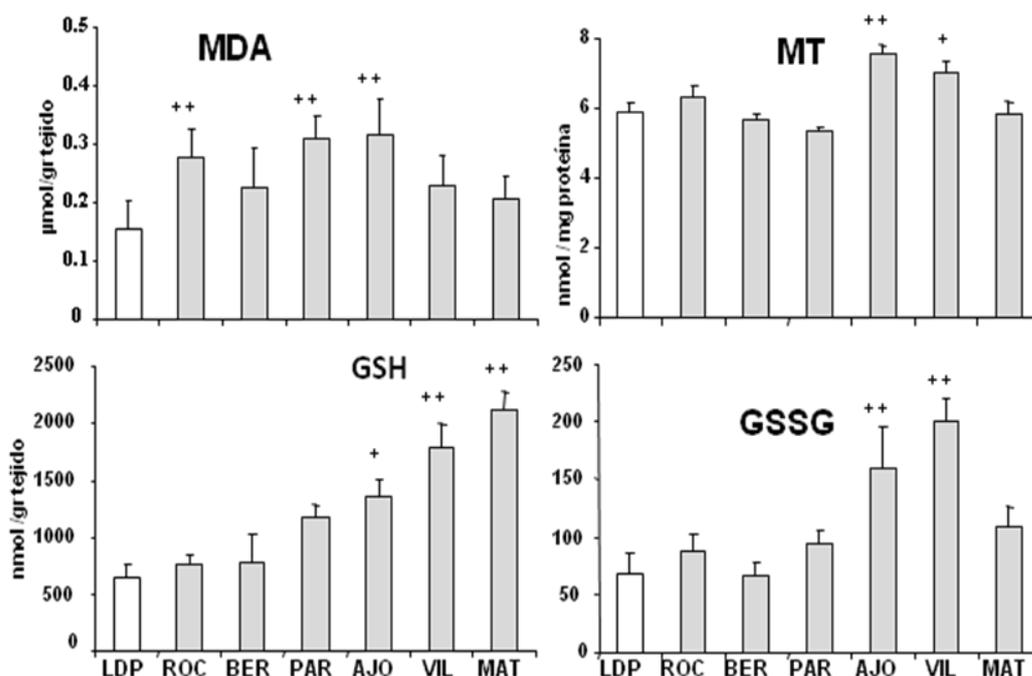


Fig. 68. *Biomarcadores analizados en otoño 2004.* Leyenda como en la Fig. 65.

Tabla 42. *Otros biomarcadores analizados en otoño 2004.* Leyenda como en la Fig. 65.

Biomarcadores	Áreas de muestreo							
	LD	LDP	ROC	BER	PAR	AJO	VIL	MAT
KAT (U/mg)	nd	12.2 ±3.96	34.9 ±11.53	16.8 ±8.34	1.61 ±0.89	21.7 ±9.77	14.9 ±9.26	4.16 ±2.89
G6PDH (mU/mg)	nd	2.4 ±0.79	0.45 ±0.17	2.56 ±0.84	1.38 ±0.41	0.96 ±0.41	3.44 ±1.54	2.45 ±0.54
GLYOX II (U/mg)	nd	0.93 ±0.18	0.55 ±0.05	0.62 ±0.13	1.35 ±0.08	1.32 ±0.23	1.18 ±0.10	1.24 ±0.30
EROD (pmoles/min.mg)	nd	1.87 ±0.10	1.18 ±0.29	1.26 ±0.32	1.87 ±0.23	1.0 ±0.20	0.76 ±0.30	2.3 ±0.40
GSTc (U/mg)	nd	15.6 ±2.47	16.1 ±1.97	13.9 ±0.64	7.43 ⁺ ±0.40	14.6 ±1.45	12.9 ±2.24	11.1 ±2.28
GPx (U/mg)	nd	0.30 ±0.09	0.42 ±0.08	0.40 ±0.07	1.13 ⁺⁺ ±0.07	0.78 ⁺ ±0.23	0.86 ⁺ ±0.14	0.75 ±0.09

Además de seguir las respuestas de los biomarcadores analizados a la contaminación durante dos años en el PND, evaluamos sus posibles variaciones estacionales, debidas a diferencias en el aporte de contaminantes (condiciones ambientales, periodo de lluvias, época de irrigación de cultivos, etc.) y al estado fisiológico de los cangrejos.

Los biomarcadores mostraron 4 patrones a lo largo de las cuatro campañas de muestreo (Fig. 69): 1) La actividad EROD tuvo una marcada variación estacional, con mínimos en primavera y máximos en otoño, en cangrejos de referencia LDP, y en BER, PAR y MAT; en cangrejos de MAT, la AChE y GSH mostraban un patrón similar. 2) Otro patrón cíclico, retrasado 6 meses, mínimos en otoño y máximos en primavera, tenían G6PDH (LD, BER), GPx (ROC,AJO), y MDA (LD). 3) Un aumento continuo de GST y GLYOX se observó en LDP y cinco de las áreas problema. 4) Una bajada continua durante las cuatro campañas se observó en MT (todas las zonas) y CbE (LD, "Rocina" y arrozales).

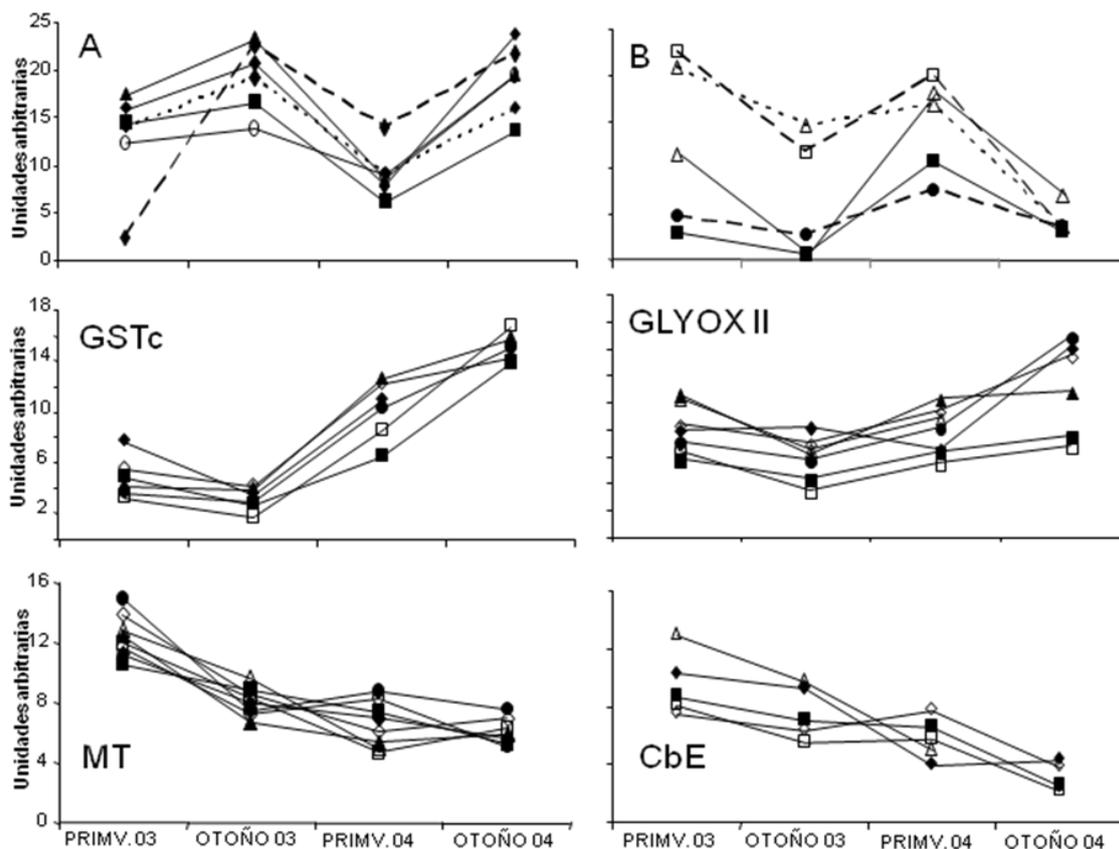


Fig. 69. Tendencias de algunos biomarcadores. Cangrejos de las zonas LD (Δ), LDP (\blacktriangle), ROC (\square), BER (\blacksquare), PAR (\circ), AJO (\bullet), VIL (\diamond) y MAT (\blacklozenge) monitorizados a lo largo de cuatro campañas de muestreo consecutivas, durante 2003 y 2004. **A**– Respuesta de las actividades EROD (—) y AChE (.....), y niveles de GSH (— —). **B**– Respuesta de las actividades G6PDH (—) y GPx (.....), y los niveles de MDA (— —).

V.4. ALTERACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN PROTEICA EN CANGREJOS DEL PND

En branquias de *P. clarkii* se estudiaron los patrones de expresión proteica tras extraer sus proteínas solubles y llevar a cabo su separación por electrophoresis bidimensional. Los cambios en las intensidades proteicas se analizaron en 3 geles repetidos de cangrejos capturados en primavera 2004 procedentes de 2 sitios de referencia –LD/LDP- y 6 sitios problema –ROC/BER, PAR/AJO, VIL/MAT. Un gel en 2 dimensiones representativo (Fig. 70) de proteínas solubles de branquias muestra más de 2,500 manchas bien resueltas, incluyendo proteínas de pI 4–7 y con subunidades de Mr comprendida entre 14–150 KDa. La figura también indica la posición de las 35 proteínas que mostraban diferencias significativas de intensidad ($p < 0.001$) al compararlas con las mismas manchas obtenidas en geles 2-DE de animales del sitio de referencia LDP. Treinta de las 35 proteínas mostraron diferencias significativas en comparación con las dos zonas de referencia, LDP/LD, y las cinco proteínas restantes sólo fueron significativas al compararlas con las intensidades en los geles 2-DE de animales capturados en LDP. Este resultado indicaba que la zona LDP podía ser considerada como la zona control de preferencia.

De las 35 proteínas con diferencias significativas de intensidad, 19 estaban sobreexpresadas en comparación con su intensidad en los geles de referencia y otras 15 proteínas tenían menor intensidad. Sólo 1 mancha, indicada por el nº 20, mostraba mayor intensidad en algunos sitios estudiados en comparación con la observada en geles de referencia mientras que su intensidad disminuía en otros sitios analizados. La mayoría de las diferencias encontradas (26/35) fueron cuantitativas, es decir, manchas cuya intensidad cambiaba >3 veces en comparación con la intensidad de la misma mancha en el sitio control. Las 9 diferencias restantes (9/35) fueron cualitativas, es decir, las manchas estaban presentes en cangrejos procedentes de sitios control, pero no se detectaban en cangrejos capturados en los sitios problema, o al contrario.

La Tabla 43 resume el análisis cuantitativo de las alteraciones observadas en las 35 manchas frente a las intensidades obtenidas en los geles realizados en animales capturados en el sitio de referencia, LDP. El nº de veces que las manchas alteradas estaban sobre- o sub-expresadas fue muy similar en todos los sitios estudiados, confirmando que los cambios eran reales y no meros artefactos.

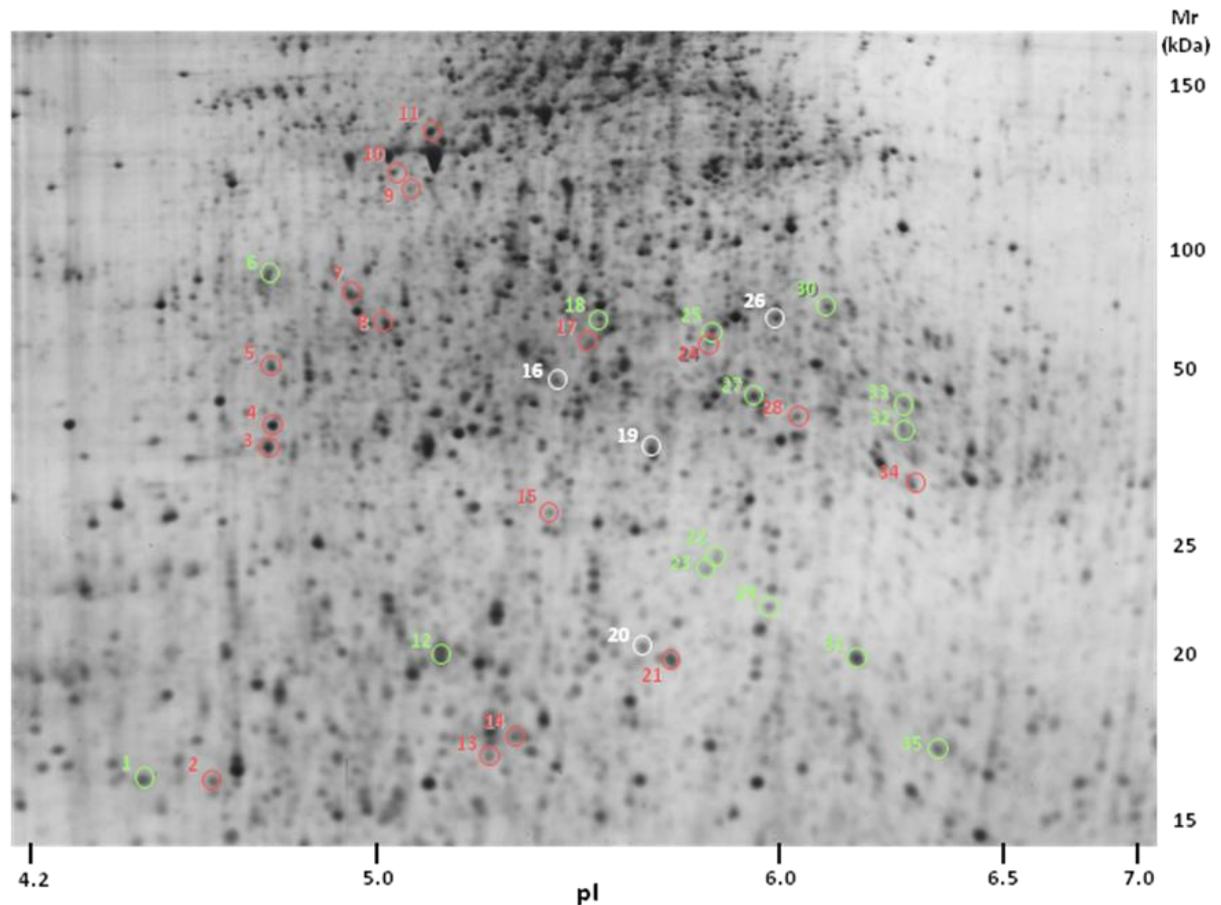


Fig. 70. *Gel 2-DE representativo del proteoma soluble de branquias de P. clarkii.* Los símbolos indican las 35 manchas con diferencias de intensidad de más de 3 veces y significación estadística ($p < 0.001$) en comparación con la zona de referencia LDP, que estaban reguladas positiva (○) o negativamente (○) en al menos dos de las áreas estudiadas, o mostraban una regulación mezclada o estaban alteradas en una sola zona (○).

En base al análisis cuantitativo se establecieron cuatro patrones:

1) *PES característico de sitios limpios o poco contaminados (LDP, LD, BER AJO):*

Este patrón de intensidades proteicas incluye 32 proteínas cuya intensidad no se alteró en comparación con la de los geles LDP. Las diferencias se limitaron a 2 manchas (n^{os} 20, 33) que estaban subexpresadas en LD, confirmando que LDP podía considerarse como el principal sitio de referencia. Una de las manchas (n^o 20) estaba subexpresada en BER, y otras dos manchas (n^{os} 32, 33) estaban subexpresadas en AJO. Las manchas 20 y 33 estaban subexpresadas en dos sitios a la vez.

2) *PES característico de sitios moderadamente contaminados (PAR):*

Este patrón incluye 22 proteínas de intensidad inalterada frente a la de sitios limpios (n^{os} 3-15, 19, 23, 25, 26, 28-32). En cambio, 13 proteínas mostraron diferencias significativas de intensidad respecto a los geles LDP: 7 de estas proteínas (n^{os} 2, 16, 17, 20, 21, 24, 34) estaban sobreexpresadas y las otras 6 (n^{os} 1, 18, 22, 27, 33, 35) subexpresadas en comparación con LDP.

- 3) *PES característico de sitios contaminados (ROC)*: Este patron incluye 26 proteínas cuya expresión estaba significativamente alterada frente al patron de animales capturados en sitios limpios. Trece de estas proteínas (n^{os} **2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 17, 28, 34**) estaban sobrepresadas y otras 13 proteínas (n^{os} **1, 6, 12, 18, 22, 23, 25, 27, 29, 31, 32, 33, 35**) subexpresadas en comparación con LDP. Solo 9 de las 35 proteínas no mostraban cambios frente al patron de LDP.
- 4) *PES característico de sitios muy contaminados (VIL, MAT)*: Este patron incluye 26 proteínas alteradas en ambos sitios de los arrozales, de ellas 14 proteínas (n^{os} **2, 3, 4, 5, 10, 11, 13, 15, 17, 20, 21, 24, 28, 34**) estaban sobrepresadas y otras 12 (n^{os} **1, 12, 18, 22, 23, 25, 27, 29, 30, 31, 33, 35**) estaban subexpresadas en comparación con LDP. Además, las manchas **7, 8, 14, 19** estaban sobrepresadas solo en VIL y la mancha **9** solo en MAT, mientras las manchas **6, 26, 32** estaban subexpresadas solo en MAT. Solo 5 proteínas permanecieron inalteradas en VIL y MAT. Todas las proteínas alteradas en sitios moderada-mente contaminados y contaminados también estaban alteradas en sitios muy contaminados con el mismo tipo de alteración (sobre o subexpresión) y n^o de veces de diferencia muy parecidos.

La Tabla 43 recoge las 35 proteínas alteradas marcadas en color verde o rojo, según sufran aumentos o disminuciones de intensidad respecto de la zona de referencia LDP. La Fig. 71 incluye detalles de 10 de esas 35 proteínas alteradas, en los histogramas se muestran las intensidades de estas manchas; comparando sus intensidades en los sitios problema frente a los de referencia. Una comparación en los sitios estudiados permite detectar dos patrones: A) Las manchas **12, 29, 31, 33 y 35**, intensas en los sitios de referencia -LDP/LD- y en sitios poco contaminados -BER/AJO- eran casi indetectables en sitios moderadamente a muy contaminados -ROC/PAR/VIL/MAT. B) Las manchas **13, 17, 21, 24 y 28**, muy débiles en los sitios limpios o poco contaminados fueron muy intensas en zonas contaminadas. De hecho, los histogramas confirman cuantitativamente las diferencias de expresión recogidas en la tabla superior. En la Fig. 71 también se incluyen las imágenes ampliadas de los geles 2-DE donde se localizan estas 10 proteínas seleccionadas. En ellas podemos visualizar los cambios de intensidad tal y como aparecen en el gel, reflejados en la tabla superior (numero de veces de diferencia) y en los histogramas (valores absolutos de intensidad). A modo de ejemplo, la mancha n^o 12 no tuvo cambios significativos en LDP/LD/BER/AJO –casillas amarillas -, aunque su intensidad fue mayor en LD, BER y AJO, como se muestra en los histogramas. Además, la mancha 12 disminuyó su intensidad 67-, 26- y 13 veces en ROC, VIL y MAT. Así puede verse en las imágenes ampliadas de cada una de las zonas, en VIL y MAT, aunque visible, esta mancha aparece aunque muy tenue.

Tabla 43. Las 35 proteínas (# como en la Fig. 70) con diferencias de intensidad significativas en branquias de *P. clarkii* muestreados en la primavera de 2004 en diferentes zonas de Doñana v.s. a la zona de referencia LDP. Cada celda muestra el número de veces que la mancha es - (■) o + (■) intensa v.s. LDP; el color amarillo indica que no existe diferencia de intensidad respecto de las mismas manchas en LDP (*nd*, no detectado; ∞, elevada intensidad de la mancha, ausente en LDP).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35			
LDP																																						
LD																				4															6			
ROC	3	4	5	4		3	3	3	4	9		6	7	∞	2	6		∞	4				nd	3		nd		nd	12	28		19	4	7	3	109		
BER																				3																		
PAR	nd	3														15	∞	4		2	3	3		12			nd							6	3	24		
AJO																																			40	21		
VIL	19	3	7	4	∞		4	5		8	3	26	∞	3	7		∞	4	3	2	3	24	3	13	9		nd	36	27	9	12		11	4	nd			
MAT	8	3	3	3	∞	9			5	6	2	13	∞		7		∞	5		3	3	7	5	13	13	12	nd	47	17	12	17	40	nd	5	Nd			

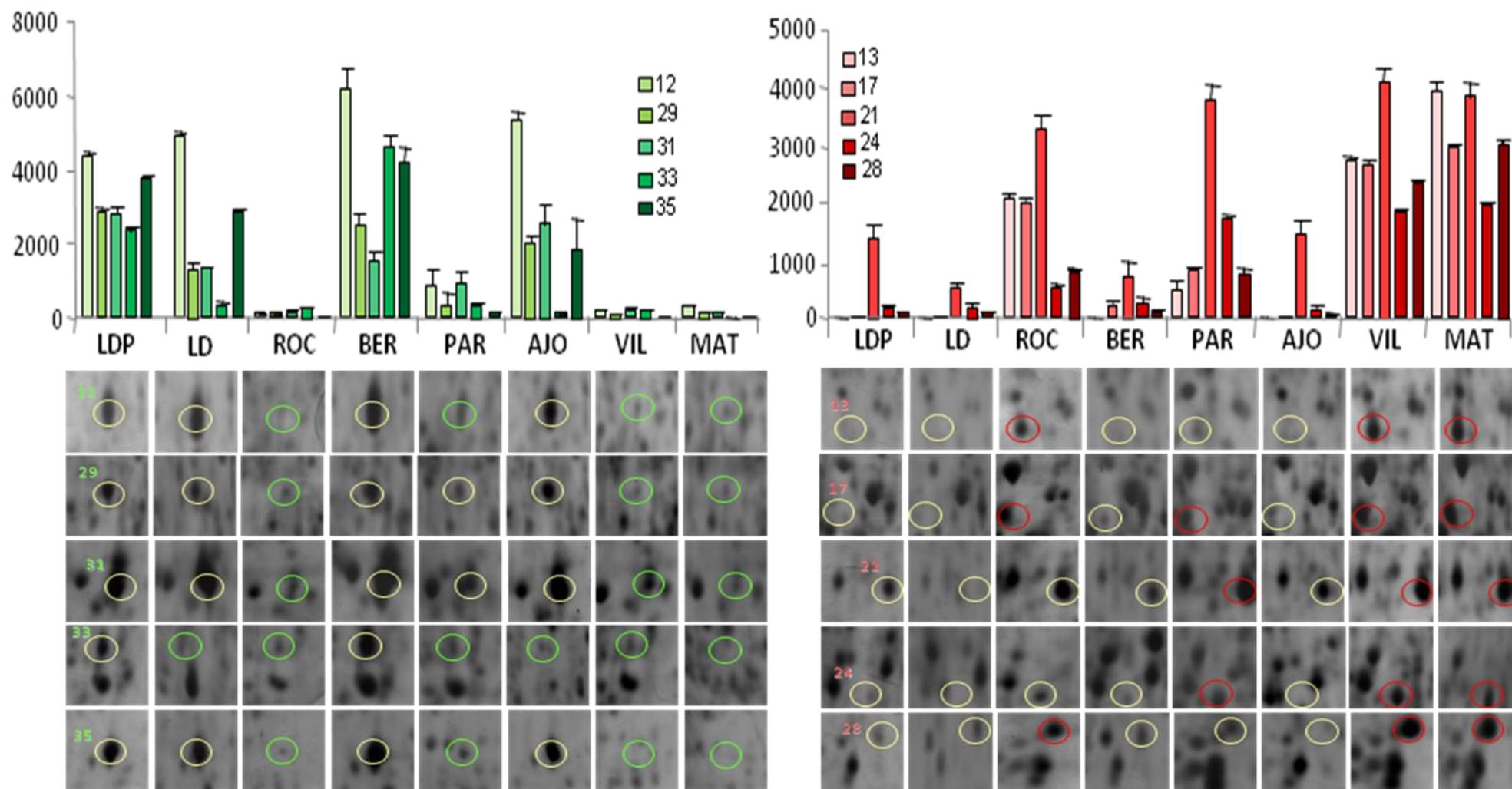


Fig. 71. *Diez de las 35 proteínas (# como en la Fig. 70) con diferencias de intensidad significativas en branquias de *P. clarkii* muestreados en la primavera de 2004 en diferentes zonas de Doñana v.s. a la zona de referencia LDP.* Los histogramas (parte superior) muestran la intensidad de estas 10 manchas seleccionadas (U arbitrarias) con patrones de bajada (izquierda) o subida (derecha). Las imágenes ampliadas del gel 2-DE (parte inferior) muestran sus diferencias de intensidad: bajadas (○) o incrementos (○) de la intensidad en las zonas problema; los círculos amarillos indican diferencias no significativas.

Discusión

I. UTILIDAD DE LAS ESTERASAS COMO BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN *P.clarkii*

Los ensayos combinados de AChE, BChE y CbE han sido propuestos como los mejores indicadores de exposición a plaguicidas en contraposición a la medida de una sólo actividad esterasa (Payne et al., 1996; Basack et al., 1998). No obstante, antes de su uso como biomarcadores, es preciso estudiar la distribución y sensibilidad de las esterasas y establecer la viabilidad de sus ensayos en la especie indicadora. El uso de AChE en el músculo de *P. clarkii* comenzó cuando (Repetto et al., 1988) mostró la sensibilidad de esta actividad esterasa al tricloroformo. Posteriormente, las actividades AChE y BChE, ensayadas en el músculo de *P. clarkii*, resultaron sensibles a fenitrotion; la AChE ha sido también ensayada en trabajos de campo (Escartin and Porte, 1996; Porte and Escartin, 1998). Sin embargo, ni la distribución tisular de las esterasas ha sido establecida ni la actividad CbE ha sido medida en *P. clarkii*.

En este trabajo se demuestra que las actividades esterasas son insignificantes en músculo de *P. clarkii* y por tanto inapropiadas para evaluar la posible exposición a plaguicidas. Por el contrario, el trabajo demuestra que la AChE debería ser ensayada en tejido nervioso y la CbE en glándula digestiva, mientras que la actividad BChE no se debe usar como biomarcador debido a la baja actividad registrada en todos los tejidos estudiados. Estudios previos habían establecido que la AChE predomina en glándula digestiva y branquias de *Mytilus galloprovincialis* y en glándula digestiva y músculo de *Perna perna* (Najimi et al., 1997). La elevada actividad AChE detectada en este trabajo en tejido nervioso de *P.clarkii* concuerda con resultados previos de otros autores (Habig et al., 1988; Habig and Di Giulio, 1991). Conviene señalar, sin embargo, que en el presente trabajo se detectaron en músculo de *P.clarkii* mayores actividades AChE y BChE que en estudios anteriores (Escartin and Porte, 1996; Porte and Escartin, 1998), probablemente debido a las diferentes condiciones de ensayo o a variaciones estacionales, como se había demostrado en *P. perna* (Najimi et al., 1997).

La actividad CbE se ha usado en especies acuáticas para evaluar la exposición a plaguicidas (Payne et al., 1996; Basack et al., 1998; Wogram et al., 2001; Barata et al., 2004). Como en mamíferos, en *P. clarkii* la CbE puede intervenir en la biotransformación de xenobióticos (Sato and Hosokawa, 1998). En crustáceos, se ha establecido que la CbE hidroliza metil farnesoato, hormona que regula la muda (Homola and Chang, 1997); es posible que en *P.clarkii* esta enzima pudiese tener una función similar. Las actividades CbE y AChE son mayores en *P.clarkii* que en *Daphnia magna* (Guilhermino et al., 2000;

Diamantino et al., 2003) o branquias de *Crassostrea rhizophorae* (Monserrat et al., 2002), probablemente debido a variaciones interespecíficas o diferencias en su distribución tisular. De hecho, la mayoría de estudios sobre la actividad AChE se han realizado en organismos completos, bránquias o glándula digestiva, mientras que hay pocos estudios en tejidos nerviosos donde la actividad AChE es mayor.

Aunque se ha descrito que la AChE se inhibe a altas concentraciones de sustrato (Mora et al., 1999; Monserrat et al., 2002), esta inhibición por exceso de sustrato no ocurre en *P.clarkii* o en otras especies acuáticas, lo que sugiere propiedades diferentes de esta enzima en estos organismos (Bonacci et al., 2004; Brown et al., 2004). El presente trabajo muestra que en *P.clarkii*, la actividad específica de las esterasas es muy parecida a la encontrada en otras especies de bivalvos, disminuyendo, en función del sustrato utilizado, en el siguiente orden: fenil-S-acetato >> acetil-S-colina \geq butiril-S-colina (Basack et al., 1998; Mora et al., 1999; Bonacci et al., 2004).

I.1. EL TRITON X-100 NO ES APROPIADO PARA EXTRAER Y ENSAYAR LAS ESTERASAS EN *P.clarkii*

Se ha descrito que la AChE puede encontrarse en dos formas: una citosólica, extraíble con baja fuerza iónica, y otra unida a membrana, que puede ser liberada de ella con la ayuda de detergentes añadidos al tampón de extracción (Bon et al., 1979; Scholz and Hopkins, 2006). No obstante, en glándula digestiva y músculo de *P.clarkii*, las esterasas son mayoritariamente citosólicas, como ocurre en otros organismos (Mora et al., 1999; Brown et al., 2004; Monserrat et al., 2002), a diferencia del tejido nervioso, con alto contenido en membranas, donde están mayoritariamente unidas a membranas. Por lo tanto, el uso de detergentes podría ayudar a extraer todas las esterasas, especialmente en tejido nervioso. Sin embargo, teniendo en cuenta las interferencias del Triton X-100 con la actividad esterasa (Rosenfeld et al., 2001), se estudió el posible efecto de este detergente con las esterasas de *P.clarkii*. Estos estudios mostraron que la presencia de Triton X-100 en los ensayos de actividad activa la AChE e inhibe la CbE y BChE. Por ello, para evitar errores en la estimación de las actividades esterasas, se excluyó el uso de este detergente en la extracción. El efecto desigual del detergente en las esterasas de *P.clarkii* confirmó que se trataba de enzimas diferentes. El Triton X-100 altera la actividad y modula la sensibilidad a inhibidores de la AChE y BChE (Jaganathan and Boopathy, 1998; Marcel et al., 2000; Rosenfeld et al., 2001). Por lo tanto, los ensayos con detergentes pero en ausencia de inhibidores no presentan problemas, mientras que si las enzimas han sido expuestas a detergentes e inhibidores su medida será errónea. Por ello, se evitó el uso de

Triton X-100 en los estudios del efecto de PMSF, iso-OMPA, y plaguicidas CM y OP modelos sobre esterasas de *P. clarkii*.

I.2. SENSIBILIDAD DE LAS ESTERASAS DE *P. clarkii* A INHIBIDORES Y PLAGUICIDAS

En *P. clarkii*, BChE y AChE son muy sensible a PMSF, un inhibidor general de las Ser-hidrolasas (Hyne and Maher, 2003). La más sensible es la BChE, mientras la AChE requiere altos niveles de PMSF para ser inhibida. La CbE tuvo una sensibilidad extraña, fue completamente inhibida en glándula digestiva pero no es afectada en músculo y tejido nervioso. Como esperábamos, las esteras muestran una alta sensibilidad al iso-OMPA, un inhibidor específico de la BChE. En glándula digestiva la esterasa más afectada es la BChE, seguida de la CbE y la AChE. En músculo o tejido nervioso no existe una clara inhibición de esterasas por iso-OMPA. Como la BChE no hidroliza fenil tioacetato (Basack et al., 1998) su contribución a la actividad CbE queda excluida. En cambio, la inhibición de la AChE por iso-OMPA, en glándula digestiva, podría ser debida al efecto de este inhibidor sobre la BChE, que también puede hidrolizar acetilcolina. Esto podría explicar la sensibilidad parcial a iso-OMPA de la AChE en glándula digestiva, con tres veces más BChE que AChE. De hecho, en extractos con baja actividad de alguna esterasa, la tasa de actividad detectada podría deberse a actividades residuales, no afectadas por inhibidores.

Considerando los bajos niveles de plaguicida necesarios y la inactivación tan rápida que éstos inducen en *P. clarkii*, los CMs son inhibidores más potentes de la AChE y de la BCh, que los OPs. Se ha descrito que *D. magna* es 100 veces más sensible a pirimicarb (CM) que a dimetoato (OP) (Andersen et al., 2006), pero se necesitan niveles de metil paraoxon 100 veces menores para que afecten a su supervivencia y/o reproducción (Duquesne et al., 2006). La reacción directa de los CMs con las esterasas explica su fuerte toxicidad, mientras que los tio-OPs tienen que ser biotransformados a su forma oxon para inhibir a las esterasas. En *P. clarkii*, la CbE tiene una sensibilidad diferente para cada plaguicida, siendo inhibida por carbaril (CM) y clorptirifos (OP), pero no por eserina (CM) o por malation (OP). La CbE muestra diferente sensibilidad según el plaguicida (Sogorb and Vilanova, 2002). Se ha descrito la baja sensibilidad de la CbE por la eserina (Galloway et al., 2002), pero la falta de sensibilidad a malation es contraria a la alta sensibilidad *in vivo* encontrada para la CbE en *D. magna* (Barata et al., 2004). Esta inhibición *in vivo* de la CbE es atribuida a la activación del malation a su forma oxon por P450 (Thompson, 1992).

I.3. RECUPERACIÓN DE LAS ESTERASAS INHIBIDAS POR PLAGUICIDAS EN *P.clarkii*

Los efectos de los OPs y CMs sobre las esterasas se diferencian por su duración. Las esterasas expuestas a CMs son reactivadas simplemente eliminando el exceso de plaguicida, mientras que los efectos de OPs son persistentes y la actividad enzimática solo se recupera después del tratamiento con oximas (Hyne and Maher, 2003). Sin embargo, es difícil distinguir si la inhibición de las esterasas se debe a la exposición a CMs o OPs, puesto que la concentración del CM tiene que disminuir lo suficiente para obtener una recuperación de la actividad enzimática, por lo que son escasos los estudios que distinguen entre ambos efectos. En el presente trabajo, se ha desarrollado un protocolo de reactivación, bajando el contenido de plaguicida, combinando la ultrafiltración y la dilución, tras la inhibición de la AChE y la CbE de *P. clarkii*, para distinguir eficientemente entre los efectos provocados por CMs y OPs.

Tras ultrafiltrar (lo que disminuye unas 10 veces la concentración plaguicida) y diluir 30 veces el extracto tratado con plaguicida, la AChE inhibida por carbaril recupera el 60% de su actividad inicial. Sin embargo, ni la incubación a temperatura ambiente durante varias horas ni el tratamiento con 2-PAM surte ningún efecto adicional. Esta reactivación concuerda con la disminución de unas 300 veces en la concentración del CM obtenida por el efecto combinado de la ultrafiltración y de la dilución. De hecho, se obtiene una reactivación significativamente mayor cuando la AChE inhibida por carbaril se somete a dos filtraciones en lugar de una, lo que permite una dilución de unas 3000 veces comparado con >300 veces menos (dilución 30) o de unas 6000 veces comparado con >600 veces menos CM (dilución 60). La reactivación de la CbE inhibida por carbaril es similar a la obtenida con la AChE, y el número de filtraciones y el grado de dilución producen de nuevo diferencias significativas. Al contrario de los efectos de los CMs, fácilmente reversibles, no se obtiene ninguna reactivación de las esterasas inhibidas por OPs al disminuir la concentración de plaguicida, de forma que la actividad AChE y CbE se recupera solo después del tratamiento con 2-PAM, de acuerdo con anteriores trabajos (Hyne and Maher, 2003), aunque se logra una mayor reactivación en la AChE que en la CbE.

I. 4. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE CONTAMINANTES Y LA INHIBICIÓN DE LAS ESTERASAS EN *P. clarkii* DE DOÑANA

La inhibición del Esterasas se utiliza como biomarcador de exposición a plaguicidas en organismos acuáticos, aunque su respuesta, sensibilidad y distribución tisular varían significativamente con la especie. Las esterasas de *P. clarkii* fueron caracterizadas, incluyendo su inhibición por OPs/CMS y su reactivación, y la inhibición/reactivación de AChE y CbE fueron propuestas como biomarcadores de exposición a plaguicidas OPs o CMs (Vioque-Fernandez et al., 2007b). Hasta el momento, pocos estudios han medido inhibición de esterasas y niveles de plaguicidas en ecosistemas naturales (De La Vega Salazar et al., 1997; Hamers et al., 2003; Robillard et al., 2003; Abdel-Halim et al., 2006). Para validar el uso de las esterasas en *P. clarkii* como biomarcadores de exposición a contaminantes en áreas acuáticas del PND, se estudió la posible correlación entre su inhibición y los niveles de contaminantes detectados en Doñana. Las actividades CbE y AChE son significativamente mayores en cangrejos muestreados en la Reserva Biológica de Doñana (referencia, LD y LDP) que en los sitios potencialmente contaminados, como PAR/AJO, a lo largo del arroyo “El Partido”, ROC/BER, a lo largo del arroyo “La Rocina”, donde se localizan extensos cultivos de cítricos y fresa, y VIL/MAT, en los cultivos de arroz cerca del río Guadiamar. La inhibición de la CbE fue más generalizada que la de la AChE, sugiriendo que CbE es un biomarcador más sensible a la exposición a OPs/CMs.

No obstante, la relación entre la inhibición de las esterasas y los niveles de plaguicidas es compleja. 1) Los animales de AJO muestran una inhibición general de las esterasas (43/34% para CbE/AChE, respectivamente) pero no se detectan plaguicidas en el suelo de AJO, y el agua tiene sólo bajos niveles de molinato. 2) Los cangrejos de ROC presentan una inhibición moderada de sus esterasas (34/20%) aunque el agua de ROC tiene sólo baja concentración de un isómero de PCB. 3) Los animales de MAT tienen sus esterasas escasamente inhibidas (18/22%) mientras que en agua y suelo de MAT se encuentran altos niveles de plaguicidas. La falta de correlación entre los niveles de plaguicidas en agua y suelo y la inhibición de esterasas nos llevó a estudiar el porcentaje de arena en suelo, que debería estar relacionado negativamente con su capacidad de inmovilizar plaguicidas. Considerando el bajo contenido de plaguicidas en suelos con un alto-bajo contenido de arena (BER vs PAR) y la variedad y alto nivel de plaguicidas en suelos con altos-bajos de arena (LD vs VIL) se excluyó esta idea. No obstante, se detecta una relación inversa entre la proporción de arena y el contenido de metales en suelo,

aunque ninguna correlación significativa existe entre el contenido de arena o metales y la inhibición de AChE o CbE. El alto contenido de metales en suelos de VIL/MAT, junto a la variedad y alto contenido de plaguicidas en agua y/o suelo de estos dos sitios, podría explicar las inhibiciones de las esterasas de los cangrejos de VIL/MAT. Sin embargo, las inhibiciones mayores de esterasas en cangrejos de AJO, ROC y PAR contrastan con los niveles moderados de plaguicidas y metales en agua y/o el suelo de estos lugares. Por todo esto, pensamos que además de los plaguicidas y de los metales, otros agentes contaminantes no considerados en nuestro estudio podrían afectar a las esterasas.

Estudios previos realizados en ecosistemas naturales han mostrado una compleja relación entre los niveles de plaguicidas y la inhibición de la AChE, que puede alterarse por la transformación de los plaguicidas inducida por ellos o por sus metabolitos (De La Vega Salazar et al., 1997), o por la variación natural de muchos factores abióticos (Robillard et al., 2003), lo que hace necesario el uso de métodos estadísticos potentes para establecer dichas correlaciones (Hamers et al., 2003), que incluso podrían no llegar a ser reconocidas (Robillard et al., 2003). Además de los plaguicidas, las esterasas son inhibidas por metales (Martinez-Tabche et al., 2001; Diamantino et al., 2003), aunque en condiciones de exposición aguda algunos metales activan a la AChE (Zatta et al., 2002; Bainy et al., 2006). De hecho, se ha descrito que Cu, Hg, Pb, Fe, Cd, Ni y As afectan a la actividad esterasa (Abou-Donia and Menzel, 1967; Olson and Christensen, 1980; Bocquene et al., 1990).

La falta de inhibición de la AChE en cangrejos de LD es extraña, a la vista de la variedad y alto contenido de plaguicidas y As en suelo de este supuesto sitio de referencia. Altos niveles de As inhiben claramente la AChE en organismos acuáticos (Bocquene et al., 1990), pero los presentes en LD podrían no ser suficientes para afectar las esterasas de *P. clarkii*. Además, ninguno de los plaguicidas encontrados en LD eran OPs o CMs, y éstos fueron encontrados solamente en suelo y no en agua, donde se encuentran generalmente los cangrejos. A pesar del uso tan extendido de la inhibición de las esterasas como biomarcador, las esterasas son sensibles sólo a algunos tipos de plaguicidas, principalmente OPs y CMs, aunque otros tipos de compuestos agroquímicos (piretroides, organoclorados, etc.) pueden estar presentes en zonas contaminadas y no inhibir a las esterasas. El origen de los plaguicidas encontrados en suelo de LD es desconocido: esta laguna solo recibe agua de lluvia, y no está conectada a ningún arroyo. De hecho, la trifluoralina se ha detectado en agua de lluvia (Trevisan et al., 1993). Además, puesto que LD recibe cada año millares de pájaros, estos podrían transferir al

suelo cualquier producto químico que se encuentre adherido a ellos, en particular a sus patas. La presencia de niveles moderados de pendimetalin en el sitio de referencia LDP podría deberse a su transporte desde áreas próximas, no incluidas en nuestro estudio, a la vista de la elevada volatilidad y constante de Henry de este plaguicida.

La reactivación de las esterasas permite, *a priori*, distinguir entre la exposición a OPs o CMs (Rotenberg et al., 1995). El efecto de los OPs solo es revertido por el tratamiento con oximas, mientras que las esterasas inhibidas por CMs son reactivadas por simple dilución del plaguicida. Las esterasas de *P. clarkii* inhibidas *in vitro* por plaguicidas CMs y OPs siguen este mismo patrón (Vioque-Fernandez et al., 2007b), mientras que la reactivación en organismos expuestos *in vivo* a OPs y CMs es compleja (Vioque-Fernandez et al., 2008a). Otros factores, como el “envejecimiento” y/o la degradación de enzimas inhibidas, afectan la reactivación en animales expuestos a OPs o CMs, por lo que se hace precisa la síntesis de nuevas moléculas de enzima para recobrar la actividad enzimática. Se ha descrito que diversas especies acuáticas necesitan semanas para recuperar las actividades esterasas tras una exposición a OPs, pero solo unas horas son precisas para recuperar sus actividades tras la exposición a CMs (Ferrari et al., 2004). En el presente trabajo se muestra que las esterasas con menor actividad que las de animales procedentes de sitios de referencia no son reactivadas ni por el tratamiento con 2-PAM ni por dilución. A pesar de los buenos resultados encontrados para distinguir entre la exposición a CMs o a OPs tras la reactivación de esterasas inhibidas *in vitro*, en estudios en el campo esta aproximación podría ser oscurecida por otros factores que pueden alterar las actividades esterasas. El presente trabajo muestra que la presencia simultánea de plaguicidas CMs y OPs, y el efecto sinérgico de contaminantes orgánicos e inorgánicos y plaguicidas (y sus productos de degradación) podrían alterar la respuesta a los protocolos de reactivación establecidos *in vitro* (Vioque-Fernandez et al., 2008b). La reactivación podría también depender del tiempo de exposición y de la concentración de plaguicidas presentes en agua, contribuyendo a una degradación total de la actividad, impidiendo su reactivación por el tratamiento con 2-PAM o por dilución.

II. EFECTOS BIOQUÍMICOS Y PROTEOMICOS DETECTADOS EN *P.clarkii* TRAS LA EXPOSICIÓN A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE CLORPIRIFOS Y CARBARIL

II.1. RESPUESTA DE LAS ESTERASAS Y OTROS BIOMARCADORES CONVENCIONALES

La medida de la inhibición de esterasas es una aproximación bien establecida y validada para monitorizar ambientes probablemente contaminados por plaguicidas (Hyne and Maher, 2003). Este trabajo responde a la falta de datos en relación a los efectos de la exposición *in vivo* a OPs y CMs en *P. clarkii*. Los efectos del clorpirifos y del carbaril fueron medidos bajo condiciones de exposición subletales en tres pasos, comenzando con biomarcadores altamente específicos: 1) la inhibición de las esterasas, 2) cambios en los biomarcadores implicados en la biotransformación o defensas antioxidativas, 3) variación en los perfiles de expresión proteica.

De acuerdo con lo esperado inicialmente, el clorpirifos inhibe extensivamente la CbE, generalmente con una relación lineal dosis-respuesta, pero no inhibe de igual forma a la AChE, que incluso aumenta a los 2 días de tratamiento. Un aumento de la síntesis de AChE para eliminar la acetilcolina acumulada mientras estaba inhibida podría explicar la subida de esta actividad, como se ha descrito tras la exposición a metales (Bainy et al., 2006). El carbaril afecta menos que el clorpirifos, puesto que éste solo inhibe a la CbE al cabo de 7 días de exposición. El presente trabajo confirma a la CbE como un biomarcador específico de la exposición a OPs más fiable que la AChE, según hemos mostrado en *P. clarkii* en los estudios de biomonitorización de ecosistemas reales (Vioque-Fernandez et al., 2007a). A diferencia de la reactivación de la CbE y la AChE conseguida por dilución o tratamiento 2-PAM tras la exposición *in vitro* de los extractos de *P. clarkii* a OPs y CMs (Vioque-Fernandez et al., 2007b), la ausencia de reactivación detectada en el presente trabajo tras la exposición *in vivo* a plaguicidas concuerda con una ausencia de reactivación similar observada en cangrejos de ecosistemas expuestos a plaguicidas muestrados en los alrededores de Doñana (Vioque-Fernandez et al., 2007a). El aumento de las actividades AChE y CbE después de la retirada de carbaril, pero no de clorpirifos, concuerda con estudios en crustáceos que necesitaron de 2 a más de 4 semanas para recuperar los niveles del control sin inhibir tras retirar los plaguicidas OPs (Barata et al., 2004). Además, otros factores podrían afectar la reactivación o recuperación de las esterasas en especímenes de cangrejos *P. clarkii* expuestos en condiciones controladas a

plaguicidas, tales como el “envejecimiento” y/o la degradación de las enzimas inhibidas, que requerirían una síntesis de nuevas moléculas de enzima.

Dado que los plaguicidas OPs y CMs causan alteraciones en otros sistemas bioquímicos (Akturk et al., 2006), también se estudiaron los efectos sobre otros biomarcadores en *P. clarkii* expuestos a plaguicida. Varios biomarcadores implicados en las fases I o II de la biotransformación, la defensa antioxidativa y los daños oxidativos en las biomoléculas también resultan alterados, aunque el clorpirifos y el carbaril tienen respuestas diferentes. Las enzimas relacionadas con la biotransformación, incluyendo el citocromo P450 asociado a la actividad EROD (fase I) y la actividad glutathion-S-transferasa (fase II), aumentan en general durante la exposición a plaguicidas, de acuerdo con trabajos anteriores de otros autores que muestran que los plaguicidas son biotransformados por el cit P450 y después conjugados por la glutathion-S-transferasa (Fujioka and Casida, 2007). Las alteraciones de las defensas antioxidantes y los daños oxidativos en los lípidos y el glutathion son difíciles de explicar pues no son las esperadas o son contradictorias. Así, la exposición a clorpirifos causa la inhibición de la actividad CAT, la bajada de los niveles de GSSG (no alto) y no afecta al MDA, y la exposición a carbaril aumenta la actividad CAT sin alterar los niveles de GSSG o de MDA. No obstante, aunque las significativas alteraciones en *P. clarkii* expuestos a plaguicida son similares a las variaciones de las defensas antioxidativas encontradas en hígado, riñón y bazo de rata (Bebe and Panemangalore, 2003), no se ha podido establecer ninguna relación causa-efecto. La ausencia de una relación directa entre las respuestas de estos biomarcadores generales, las dosis del plaguicida y los tiempos de exposición indica que, al contrario que la inhibición de las esterasas, estos sistemas biotransformadores o de respuesta a los daños oxidativos no son los biomarcadores más adecuados para la exposición a plaguicidas OPs y CMs.

II.2. UTILIDAD DE LA APROXIMACIÓN PROTEÓMICA PARA MEDIR LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN *P. clarkii*

Los biomarcadores convencionales son propuestos *a priori* para la evaluación de la contaminación dado que se conocen bien sus papeles biológicos, aunque estos biomarcadores bien establecidos suponen una búsqueda sesgada. A diferencia de ellos, la Proteómica es una herramienta de gran alcance en Ecotoxicología, dado que tiene un alto potencial para identificar nuevos biomarcadores y conocer mejor los mecanismos de toxicidad de los contaminantes (Dowling and Sheehan, 2006; Lopez-Barea and Gomez-Ariza, 2006; Monsinjon and Knigge, 2007). Los estudios de Proteómica Ambiental

comenzaron al describirse los patrones de expresión proteica tras el análisis 2-DE de mejillones y peces expuestos a contaminantes (Shepard and Bradley, 2000; Shepard et al., 2000; Bradley et al., 2002). Más tarde, nuestro grupo demostró que la expresión de 15 proteínas se altera en almejas expuestas a varios contaminantes modelo. Cuatro de estas proteínas, identificadas por secuenciación *de novo*, estaban relacionadas con la estructura /function del citoesqueleto (Rodríguez-Ortega et al., 2003). A pesar de los estudios realizados en organismos modelo, todavía hay pocos trabajos de investigación en animales no-modelo de ecosistemas naturales. En mejillones contaminados por PHAs y metales se inducen varios péptidos, detectados mediante análisis por SELDI-TOF (Knigge et al., 2004). La contaminación de Doñana por plaguicidas y metales derivados del accidente de la presa de Aznalcollar, ha sido monitorizada con una aproximación proteómica, usando ratones y cangrejos como bioindicadores en ecosistemas terrestres y de agua dulce, respectivamente (Lopez-Barea and Gomez-Ariza, 2006) y en el bivalvo *Scrobicularia plana* en el estuario del Guadalquivir (Romero-Ruiz et al., 2006). Sin embargo, el uso de la aproximación proteómica en Ecotoxicología todavía está en sus inicios, debido a la baja representación de las secuencias de proteínas ó genes de los bioindicadores en las bases de datos, lo que obstaculiza de forma muy importante la identificación de proteínas cuya expresión se altera por MALDI-TOF-PMF (Dowling and Sheehan, 2006; Lopez-Barea and Gomez-Ariza, 2006; Monsinjon and Knigge, 2007). Aunque esta dificultad puede eludirse acudiendo a la secuenciación *de novo* (Rodríguez-Ortega et al., 2003; Romero-Ruiz et al., 2006), esta es una estrategia costosa, que lleva mucho tiempo, y muy compleja si se quiere utilizar en estudios rutinarios de biomonitorización, especialmente si se usa como especie bioindicadora un organismo no-modelo como *P. clarkii*, ausente de las bases de datos de secuencia. Por ello, en este estudio hemos evitado identificar las proteínas alteradas tras la exposición a plaguicidas, limitándonos a detectar la alteración específica de las PESs para cada plaguicida.

La expresión proteica se estudió en tejido nervioso y branquias de *P. clarkii*, pero no en glándula digestiva, debido a la alta actividad de proteasas que hay en este último órgano (Teschke and Saborowski, 2005), lo que interfiere en el análisis 2-D de sus extractos, como confirma la ausencia de manchas en la zona superior del gel 2D en este proteoma. En cambio, los proteomas de branquias y tejido nerviosos muestran más de 2000 proteínas con patrones totalmente distintos en ambos órganos, de acuerdo con sus diferentes estructuras y funciones. La alta calidad de ambos proteomas y la respuesta inadecuada de los biomarcadores convencionales nos animaron a emprender una

búsqueda no sesgada y global de las proteínas alteradas por los plaguicidas. Un total de 107 manchas muestran diferencias significativas de intensidad tras la exposición a clorpirifos o carbaril. Treinta y cinco de ellas han sido clasificadas en 4 PESs específicas de cada plaguicida y órgano, que pueden ser útiles para estudios futuros. De hecho, la utilidad de la aproximación proteómica basada en las PESs ya fue establecida en los estudios realizados en bivalvos y peces (Shepard and Bradley, 2000; Shepard et al., 2000; Bradley et al., 2002).

El análisis cuantitativo de las proteínas alteradas demuestra que el clorpirifos altera la expresión del doble de manchas que el carbaril (72 vs 35), de acuerdo con la mayor sensibilidad de la CbE y la AChE a los OPs que a los CMs. El clorpirifos afecta más extensivamente al tejido nervioso que a las branquias (45 manchas vs 27). La mayoría de las proteínas alteradas son sobreexpresadas. La variación a lo largo del tiempo de varias manchas alteradas fue similar a las variaciones observadas en algunos biomarcadores convencionales, con alteraciones importantes a baja concentración de plaguicida pero no en la exposición moderada. La semejanza entre los patrones de los biomarcadores convencionales y las alteraciones de las proteínas indica que dichas alteraciones son reales y no meros artefactos.

Muchas proteínas con una expresión significativamente alterada en organismos de sitios contaminados se han relacionado con la biotransformación o el estrés oxidativo promovido por contaminantes. Así, en bivalvos expuestos a agentes contaminantes, se identificaron cuatro proteínas del citoesqueleto, que estaban oxidadas o habían sufrido proteolisis debido a la exposición al contaminante (Rodríguez-Ortega et al., 2003). Dos enzimas relacionadas con el estrés oxidativo también fueron identificadas entre las 16 proteínas sobreexpresadas en bivalvos de sitios contaminados por metales en el estuario de Guadalquivir (Romero-Ruiz et al., 2006). Un número creciente de proteínas carbaniladas y glutacionizadas también ha sido observado en bivalvos de sitios contaminados o expuestos a condiciones oxidativas (McDonagh et al., 2005). Recientemente, en *Mus spretus* de sitios contaminados por plaguicidas y metales en el estuario de Huelva, se han identificado varias proteínas sobreexpresadas relacionadas con la biotransformación y el estrés oxidativo, habiéndose observado asimismo la aparición de formas modificadas de hasta 2 unidades de pH inferior al valor de su forma nativa o truncadas, que han sido provocadas por las modificaciones oxidativas causadas por los contaminantes detectados en la zona (Montes-Nieto et al., 2007).

III. EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DEL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA EN *P. clarkii*: INTEGRACIÓN DE LOS BIOMARCADORES CONVENCIONALES Y EFECTOS PROTEOMICOS

III.1. MEDIDA DE LA CONTAMINACIÓN USANDO BIOMARCADORES CONVENCIONALES

En este trabajo hemos tratado de evaluar el estado de la contaminación de seis sitios problema en el PND y alrededores, usando como sitios de referencia dos sitios del interior de la Reserva Biológica de Doñana. Se utilizaron doce biomarcadores, alterados por plaguicidas, contaminantes orgánicos y productos químicos prooxidantes, en lo que hemos denominado aproximación “convencional” (López-Barea and Pueyo, 1998). De ellos, la actividad catalasa ha sido siempre muy discriminante, puesto que los cangrejos de sitios problema tienen menor actividad que los animales de las zonas de referencia, probablemente debido a la presencia de compuestos inhibidores. Así, la cianamida - un fertilizante, regulador de crecimiento y plaguicida probablemente usado en los sitios problema-, inhibe la KAT (DeMaster et al., 1986). También, los compuestos prooxidativos, como los metales con actividad redox, probablemente usados en los sitios problema, inducen la hemo oxigenasa (Maines and Gibbs, 2005; Ryter and Choi, 2005) que promueve la degradación de grupos hemo, esenciales para la actividad KAT.

Las dos actividades esterases, CbE y AChE, han resultado también muy discriminantes, confirmándose su uso como excelentes biomarcadores útiles para diagnosticar contaminación por plaguicidas sin necesidad de análisis químicos (Peakall, 1994). Ambas esterases son más bajas en los sitios problema, demostrando la presencia de plaguicidas (Vioque-Fernandez et al., 2007a) y metales, que potencian su inhibición (Diamantino et al., 2003). En las 4 campañas y los 6 sitios problema estudiados, la CbE es significativamente menor en 16 de las 24 (campañas x sitios) muestras (67%) y la AChE es menor en 18/24 casos (75%). Junto a estas inhibiciones generalizadas, la actividad CbE aumentó significativamente en MAT (otoños 03 y 04) y PAR (otoño 04), es decir, en 3 de los 24 casos (12.5%).

La actividad CbE fue más alta solamente en otoño, tras el uso extensivo de metales como fungicidas, durante el verano en los campos del arroz, junto a MAT, y junto a los cultivos de cítricos, próximos a PAR. La AChE del molusco bivalvo *Perna perna* aumenta tras la exposición aguda a Cd o Pb (Bainy et al., 2006), que inhiben el receptor de la ACh y aumentan probablemente la síntesis de AChE para restablecer los niveles del

neurotransmisor. Este aumento también podría deberse a la sobreexpresión del gen de la AChE, tras el efecto inhibitorio inicial de los metales, aunque los mecanismos implicados deben ser estudiados (Bainy et al., 2006). El aumento de las actividades CbE y AChE fue recientemente demostrado tras la exposición *in vivo* de *P. clarkii* a plaguicidas OPs y CMs (Vioque-Fernandez et al., 2008a). La inhibición de la CbE durante las 4 campañas podría reflejar un uso creciente de plaguicidas en Doñana y los alrededores. Esto está de acuerdo con la tendencia creciente de la GLYOX II y GSTc, observada en la mayoría de los sitios durante las cuatro campañas realizadas en el actual estudio. Curiosamente, mientras la GSTc es inducida por los contaminantes en mamíferos (Ruiz-Laguna et al., 2001) y bivalvos (Rodríguez-Ortega et al., 2003; Romero-Ruiz et al., 2006), los cangrejos mostraron una GSTc más baja (no mayor) en los sitios problema comparados con el sitio de referencia LDP, aunque en general sin diferencias significativas.

Los contaminantes prooxidantes promueven la respuesta de algunos biomarcadores, como el aumento de MDA - un producto de la peroxidación lipídica-, GSH -principal antioxidante citosólico- y el GSSG -su forma oxidada- (Ruiz-Laguna et al., 2001; Rodríguez-Ortega et al., 2003; Romero-Ruiz et al., 2006). Un aumento del MDA en las zonas problema en algunas campañas, ROC (en 3 campañas), BER, PAR y AJO (en 1), y del GSSG, en PAR (1), AJO (2), VIL (3) y MAT (1), sugieren la existencia de metales y compuestos oxidantes en los sitios problema. El alto contenido de GSH fue asociado generalmente a un bajo nivel de GSSG y viceversa. Otro biomarcador, GPx, también específico de los compuestos prooxidantes, fue menos eficaz, aunque su aumento en PAR, AJO, VIL y MAT, ratificó estos sitios como contaminados.

La actividad de EROD ligada al citocromo P4501A es el biomarcador seleccionado por la mayoría de los investigadores como específico para los contaminantes aromáticos orgánicos, especialmente en los vertebrados (Goksoyr, 1995), mientras que en invertebrados, aunque su actividad es más baja, es medible y también inducible por agentes contaminantes (Fernandes et al., 2002). Aunque en contra de nuestras expectativas, la actividad EROD no es alterada en cangrejos del PND y alrededores, esta actividad de la Fase I aumenta en los cangrejos de los arrozales, VIL, en otoño 2003. A excepción de esta inducción de EROD, los animales de sitios problema tienen menos actividad EROD que los de sitios de referencia, aunque las diferencias no son significativas. Obsérvese, que el citocromo P450, una enzima que contiene hemo, disminuye en los sitios con contaminantes prooxidantes, debido a la inducción de la hemo-oxigenasa, como se ha discutido anteriormente.

Las metalotioneinas son biomarcadores que responden a metales, especialmente en los ecosistemas acuáticos (Roesijadi, 1994; Alhama et al., 2006; Martin-Diaz et al., 2006). Las MTs fueron discriminantes en primavera/ otoño 2004, y mayores en los sitios problema, BER, PAR/AJO, y VIL/MAT, probablemente debido a la existencia de metales derivados de los plaguicidas/algicidas usados en agricultura. Sin embargo, la disminución continua de las MTs en todas las zonas a lo largo de las cuatro campañas podría reflejar una menor presencia de metales en Doñana y sus alrededores, de acuerdo con las tendencias a la baja de GPx y MDA.

Dos sitios fueron seleccionados inicialmente como referencias, LD y LDP, ambos en la Reserva Biológica de Doñana y libres de la mayoría de los contaminantes. Tras el estudio de biomarcadores, LDP fue seleccionado como la referencia mas adecuada. De hecho, altas actividades KAT, CbE, AChE, y bajos niveles de MDA, GSSG y MTs se encontraron siempre en LDP, mientras que LD tenía niveles anormales (más parecidos a los de las zonas problemas) en varios biomarcadores, incluyendo altos niveles de GST (primavera 03), MDA y MTs (otoño 03) y MDA (primavera 04), y baja actividad CbE (primavera 04).

III. 2. LA PROTEOMICA AMBIENTAL COMO MEDIDA DE LA CONTAMINACIÓN

La Proteómica es una herramienta de gran alcance en Ecotoxicología, con gran potencial para identificar nuevos biomarcadores y conocer mejor los mecanismos de toxicidad de los contaminantes (Dowling and Sheehan, 2006; Lopez-Barea and Gomez-Ariza, 2006; Monsinjon and Knigge, 2007).

Un total de 35 manchas presentaron diferencias de intensidad en cangrejos de los alrededores del PND frente a los animales capturados en el corazón de Doñana. El análisis cuantitativo demostró que la mayoría de las manchas alteradas aparecieron en cangrejos de VIL/MAT con PESs similar, las mismas proteínas alteradas, el mismo modo (+/-) de regulacion y el mismo número de veces de diferencia. En sitios donde se cultiva arroz, 15 proteínas fueron reguladas negativamente y 19 fueron reguladas positivamente; los cambios de intensidad en cada proteína fueron similares en ambos sitios. En cambio, los cangrejos de LD, BER y AJO tenían pocas proteínas alteradas comparadas con las de LDP, todas reguladas negativamente, en grado bajo en LD/BER y más extensivamente en AJO. La gran coincidencia de las proteínas alteradas en sitios contaminados y muy contaminados y las alteradas en zonas limpias o poco contaminadas confirmó que tales cambios eran reales y no artefactos.

Muchas proteínas alteradas en organismos de sitios contaminados se relacionan con la biotransformación o el estrés oxidativo (López-Barea and Pueyo, 1998). Así, 4 proteínas del citoesqueleto fueron identificadas en almejas expuestas a agentes contaminantes, tropomiosina, cadena ligera de la miosina, la actina y su forma truncada, fueron oxidadas y/o truncadas (Rodríguez-Ortega et al., 2003). Las etiquetas de secuencia de 16 proteínas reguladas positivamente fueron obtenidas en almejas contaminadas por metales en el estuario del Guadalquivir, incluyendo 8 proteínas inducidas por agentes contaminantes en organismos modelo, pero solo 2 fueron identificadas inequívocamente, la hipoxantina-guanina P-ribosiltransferasa y la deshidrogenasa de gliceraldehido-3-P, que fueron propuestos como nuevos biomarcadores (Romero-Ruiz et al., 2006). El aumento de la carbonilación y la glutationilación de las proteínas fue demostrado en mejillones de sitios contaminados (McDonagh et al., 2005). Dieciseis proteínas relacionadas con la biotransformación y el estrés oxidativo fueron identificadas en ratones de vida libre de ecosistemas contaminados, encontrando las formas ácidas/truncadas de las mismas atribuidas a las modificaciones oxidativas (Montes-Nieto et al., 2007). Once proteínas fueron reguladas positivamente, α -tubulina, triosa-P isomerasa, GSH peroxidasa 1 y su forma ácida, fructosa-1,6-bifosfatasa 1, Cys proteasa ATG4B, Gly-N-metil-transferasa, ornitina transcarbamilasa, peroxiredoxina-6, HMG-CoA sintasa, y Met-adenosil-transferasa. Otras 5 fueron reguladas negativamente, enoyl-CoA hidratasa, peroxiredoxina-1/2, L-Asp deshidrogenasa y GSH transferasa ω -1, ésta probablemente protege a los ratones del arsénio.

III. 3. INTEGRACIÓN DE LOS BIOMARCADORES CONVENCIONALES Y LA APROXIMACIÓN PROTEOMICA

En nuestro trabajo pretendimos determinar la contaminación en Doñana mediante dos aproximaciones: las respuestas de biomarcadores convencionales, con reconocida sensibilidad a contaminantes, fueron integradas con la búsqueda masiva de proteínas con expresión alterada por aproximación Proteómica. Nuestra primera conclusión es que la aproximación proteómica es marcadamente superior a la respuesta de los biomarcadores usados en los estudios ecotoxicológicos. Así, mientras que solo 7 de los 12 biomarcadores convencionales discriminaron entre sitios de referencia y problema, el estudio de los geles 2-D detectó 35 proteínas significativamente alteradas de las 2.500 proteínas bien resueltas que integran el estudio, con un mayor poder discriminatorio y un

resultado lógico debido la investigación masiva, casi 200 veces más tipos de especies (2.500/12). Las respuestas de los biomarcadores convencionales cumplieron las expectativas, con 7 biomarcadores discriminantes, KAT, CbE, AChE, GSH, GSSG, MDA, MT, y 5 sin alteraciones significativas. Como en la mayoría de estudios de este tipo (van der Oost et al., 2003), hay contradicciones en las respuestas de los biomarcadores y sus diferencias son limitadas, siendo visibles sólo después de análisis estadísticos. La alteración de las esterasas, de las enzimas ligadas a la biotransformación y los biomarcadores de estrés oxidativo sugiere que los arroyos de la “Rocina” y el “Partido” y los arrozales son sitios probablemente contaminados, aunque sin diferencias claras entre las zonas ROC/PAR externas al Parque (localizadas aguas arriba de los arroyos “Rocina” y “Partido”, respectivamente) y las zonas BER/AJO (aguas abajo de ambos arroyos) cercanas a Doñana. Las respuestas de los biomarcadores identificaron como no contaminados los sitios de referencia LD y LDP, dentro de la Reserva Biológica de Doñana.

En contraste con la respuesta moderada de los biomarcadores convencionales, 35 proteínas alteradas tenían grandes cambios de intensidad (de 3 - >a 109-veces), uniformemente distribuida entre subidas y bajadas de su expresión. Comparado a la clasificación tentativa de sitios problema y de referencia basados en la respuestas de los biomarcadores convencionales, los cambios de intensidad de las 35 proteínas clasificaron los sitios en las siguientes categorías: 1) La zona de referencia preferida, LDP, dentro de la Reserva Biológica de Doñana. 2) Tres lugares limpios o débilmente contaminados, LD dentro de la Reserva Biológica de Doñana, con 2 manchas reguladas negativamente v.s. a LDP, y BER y AJO en los cursos bajos de los arroyos “Rocina” y “Partido” en los límites del PND, con 1 mancha positivamente (+) y 2 (-) expresadas, respectivamente. 3) Un sitio moderadamente contaminado, PAR en el curso alto de “Partido”, afectado por los compuestos usados en los cultivos de fresa y uva, con 13 manchas (+) y 6 manchas (-) reguladas. 4) Una zona contaminada, ROC en el curso alto del arroyo “Rocina”, también afectado por estos agroquímicos, con 13 manchas reguladas (+) y 13 reguladas (-). 5) Dos sitios altamente contaminados, VIL y MAT, situados en arrozales al oeste del PND, donde los plaguicidas, los algicidas y los fungicidas se han utilizado extensivamente, con el mayor número de manchas alteradas.

La utilidad de *P. clarkii* como bioindicador se ha confirmado en el actual estudio, puesto que tanto los biomarcadores convencionales de contaminación como la alteración de la expresión proteica (SEPs) respondieron en los 8 sitios estudiados de Doñana y

alrededores. La superioridad de la aproximación proteómica para monitorizar la contaminación ambiental también ha sido establecida claramente, puesto que 4 SEPs diferentes fueron establecidos, basados en las intensidades relativas de las 35 proteínas con diferencias de expresión detectadas. Según nuestra hipótesis inicial, los sitios LDP y LD dentro de la Reserva Biológica de Doñana están esencialmente libres de contaminantes, a pesar de las respuestas crecientes de varios biomarcadores convencionales en el corazón del PND (Bonilla-Valverde et al., 2004).

Mientras que los sitios localizaron cerca de los límites del PND están levemente contaminados, la mayor respuesta proteómica detectada en los cursos superiores de los arroyos “Rocina” y “Partido” indican que los agroquímicos no-persistentes, incluyendo los organofosforados y los carbamatos, son los utilizados preferentemente en los alrededores de Doñana, aunque la inhibición progresiva de las esterasas y el aumento de la GSTc a lo largo del estudio indican un uso creciente de plaguicidas en este área. Las mayores respuestas proteómica corresponden a las zonas de arrozal situadas entre el río Guadiamar y el río Guadalquivir, de acuerdo al uso extendido e intensivo de agroquímicos en tales áreas.

Conclusiones

1. Las actividades AChE, en tejido nervioso de *P. clarkii*, y CbE, en glándula digestiva, se proponen como biomarcadores de exposición a plaguicidas OPs y CMs, evitando el uso de Triton X-100 en el tampón de extracción.

2. La reactivación de AChE y CbE de *P. clarkii*, inhibidas *in vitro* por CMs y OPs modelo, que diferencia entre inhibición reversible o irreversible, no es eficaz en el tratamiento *in vivo* ni en la biomonitorización de Doñana.

3. La inhibición de esterasas y la medida de plaguicidas y metales en agua y suelo sugieren que los arrozales, junto al arroyo Guadiamar, son las áreas más contaminadas, seguidas de las zonas de cultivo, junto a los arroyos Partido y Rocina.

4. En exposiciones *in vivo*, *P. clarkii* es más sensible a clorpirifos que a carbaril en base a la mayor inhibición de las esterasas y el mayor número de proteínas alteradas, siendo la CbE el biomarcador más sensible a plaguicidas.

5. La aproximación proteómica supera a los biomarcadores convencionales en el estudio de la exposición a plaguicidas, sobre todo usando la alteración de las señales de expresión proteica. Las proteínas alteradas podrían servir como biomarcadores de exposición.

6. Los cangrejos de sitios contaminados responden a plaguicidas y compuestos prooxidantes, en base al descenso de CbE, AChE y KAT, y el aumento de MDA, MT y glutatión, confirmando a *P. clarkii* como bioindicador. La estacionalidad de EROD, AChE, GSH, G6PDH, GPx y MDA, refleja la necesidad de la monitorización continua.

7. El descenso de MT durante las 4 campañas refleja la bajada de los metales, y la disminución de CbE el aumento de plaguicidas en Doñana y su entorno. Esto confirma la creciente actividad agrícola, la menor actividad minera y los eficaces trabajos de limpieza tras el desastre de Aznalcollar.

8. Frente al escaso poder discriminante de los biomarcadores “convencionales”, la respuesta proteómica segrega los 6 sitios problema por su grado de contaminación. La

utilidad de la aproximación proteómica, y en especial las PES, en la monitorización ambiental ha sido claramente establecida.

9. Las respuestas de los biomarcadores convencionales y la proteómica confirman la presión a la que está sometida Doñana. Los arroyos Rocina y Partido y los arrozales muestran PES alteradas y unos niveles de estrés oxidativo e inhibición de esterasas alarmantes. En cambio, las zonas interiores del Parque muestran PES poco alteradas.

Bibliografía

- Abdel-Halim, K.Y., Salama, A.K., El-Khateeb, E.N., Bakry, N.M.**, 2006. Organophosphorus pollutants (OPP) in aquatic environment at Damietta Governorate, Egypt: implications for monitoring and biomarker responses. *Chemosphere* 63, 1491-1498.
- Abernethy, M.H., Fitzgerald, H.P., Ahern, K.M.**, 1988. An enzymatic method for erythrocyte acetylcholinesterase. *Clin Chem* 34, 1055-1057.
- Abou-Donia, M.B., Menzel, D.B.**, 1967. Fish brain cholinesterase: its inhibition by carbamates and automatic assay. *Comp Biochem Physiol* 21, 99-108.
- Akturk, O., Demirin, H., Sutcu, R., Yilmaz, N., Koylu, H., Altuntas, I.**, 2006. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat heart and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. *Cell Biol Toxicol* 22, 455-461.
- Albaiges, J., Algaba, J., Arambarri, P., Cabrera, F., Baluja, G., Hernandez, L., Castroviejo, J.**, 1987. Budget of organic and inorganic pollutants in the Doñana National Park (Spain). *Sci Tot Environ* 63, 13-28.
- Aldridge, W.N.**, 1993. The esterases: perspectives and problems *Chem. Biol. Interact.* 87,5-13.
- Aldridge, W.N., Reiner, E.**, 1972 *Enzyme Inhibitors as Substrates, Interactions of Esterases with Esters of Organophosphorus and Carbamic Acids.* , North-Holland, Amsterdam.
- Alhama, J., Romero-Ruiz, A., Lopez-Barea, J.**, 2006. Metallothionein quantification in clams by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization. *J Chromatogr A* 1107, 52-58.
- Alhama, J., Ruiz-Laguna, J., Rodriguez-Ariza, A., Toribio, F., Lopez-Barea, J., Pueyo, C.**, 1998. Formation of 8-oxoguanine in cellular DNA of *Escherichia coli* strains defective in different antioxidant defences. *Mutagenesis* 13, 589-594.
- Alonso, E., Santos, A., Callejon, M., Jimenez, J.C.**, 2004. Speciation as a screening tool for the determination of heavy metal surface water pollution in the Guadiamar river basin. *Chemosphere* 56, 561-570.
- Anastacio, P.M., Marques, J.C.**, 1995. Population Biology and Production of the Red Swamp Crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) in the Lower Mondego River Valley, Portugal. *Journal of Crustacean Biology* , 15. 156-168.
- Andersen, T.H., Oslash, T.J., Oslash, R.H., Wollenberger, J.R., Slothuus, L., Baun, A.**, 2006. Acute and chronic effects of pulse exposure of *Daphnia magna* to dimethoate and pirimicarb, pp. 1187-1195.
- Aragon, S., Claudinot, S., Blais, C., Maibeche, M., Dauphin-Villemant, C.**, 2002. Molting cycle-dependent expression of CYP4C15, a cytochrome P450 enzyme putatively involved in ecdysteroidogenesis in the crayfish, *Orconectes limosus*. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 153-159.
- Arambarri, P., Cabrera, F., González-Quesada, R.**, 1996. Quality evaluation of the surface waters entering the Doñana National Park (SW Spain). *Sci Tot Environ* 191, 185-196.
- Arun, S., Rajendran, A., Subramanian, P.**, 2006. Subcellular/tissue distribution and response to oil exposure of the cytochrome P40-dependent monooxygenase system and glutathione S-transferase in freshwater prawns. *Exotoxicology* 15, 341-346.
- Bainy, A.C.D., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., Almeida, E.A.**, 2006. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. *Biotemas* 19, 35-39.
- Barata, C., Solayan, A., Porte, C.**, 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 66, 125-139.
- Barrenetxea, C.O., Serrano, A.P., Delgado, M.N.G., Vidal, F.J.R., Blanco, J.M.A.**, 2003. *Contaminación Ambiental. Una visión desde la química.* Thomson, Madrid.
- Barrier, M., Mirkes, P.E.**, 2005. Proteomics in developmental toxicology. *Reprod Toxicol* 19, 291-304.
- Basack, S.B., Oneto, M.L., Fuchs, J.S., Wood, E.J., Kesten, E.M.**, 1998. Esterases of *Corbicula fluminea* as biomarkers of exposure to organophosphorus pesticides. *Bull Environ Contam Toxicol* 61, 569-576.
- Bebe, F.N., Panemangalore, M.**, 2003. Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissues of rats. *J Environ Sci Health B* 38, 349-363.
- Beers, R., Sizer, I.**, 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195, 133-139.

- Berggren, K., Chernokalskaya, E., Steinberg, T.H., Kemper, C., Lopez, M.F., Diwu, Z., Haugland, R.P., Patton, W.F., 2000. Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* 21, 2509-2521.
- Berggren, K.N., Schulenberg, B., Lopez, M.F., Steinberg, T.H., Bogdanova, A., Smejkal, G., Wang, A., Patton, W.F., 2002. An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation. *Proteomics* 2, 486-498.
- Bocquene, G., Galgani, F., Truquet, P., 1990. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* 30, 75-89.
- Bon, S., Vigny, M., Massoulie, J., 1979. Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2546-2550.
- Bonacci, S., Browne, M.A., Dissanayake, A., Hagger, J.A., Corsi, I., Focardi, S., Galloway, T.S., 2004. Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colbecki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. *Mar Pollut Bull* 49, 445-455.
- Bonilla-Valverde, D., Ruiz -Laguna, J., Muñoz, A., Ballesteros, J., Lorenzo, F., Gómez-Ariza, J.L., López-Barea, J., 2004. Evolution of biological effects of Aznalcóllar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers. *Toxicology* 197, 123-138.
- Borhan, B., Ko, Y., Mackay, C., Wilson, B.W., Kurth, M.J., Hammock, B.D., 1995. Development of surrogate substrates for neuropathy target esterase. *Biochim Biophys Acta* 1250, 171-182.
- Bosron, W.F., Dean, R.A., Brzezinski, M.R., Pindel, E.V., 1997. Human liver cocaine carboxylesterases. *NIDA Res Monogr* 173, 27-34.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bradley, B.P., Shrader, E.A., Kimmel, D.G., Meiller, J.C., 2002. Protein expression signatures: an application of proteomics. *Mar Environ Res* 54, 373-377.
- Brown, M., Davies, I.M., Moffat, C.F., Redshaw, J., Craft, J.A., 2004. Characterisation of choline esterases and their tissue and subcellular distribution in mussel (*Mytilus edulis*). *Mar Environ Res* 57, 155-169.
- Brown, R.K., Kelly, F.J., 1996. Peroxides and others products. *Free Radicals: a Practical Approach*. Punchard NA, Kelly FJ. Oxford, IRL Press, 119-131.
- Buhler, D.R., Williams, D.E., 1988. The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquat. Toxicol.* 11, 19-28.
- Calamari, D., 2002. Assessment of persistent and bioaccumulating chemicals in the aquatic environment. *Toxicology* 181-182, 183-186.
- Calambokidis, J., Francis, J., 1994. Marine Mammal Exposure to PCB and DDT Contamination in the Southern California Bight. Cascadia Research, Olympia, Washington.
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 2004. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem Res Toxicol* 17, 983-998.
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 2005. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chem Biol Interact* 157-158, 277-283.
- Castroviejo, J., 1993. Mapa del Parque Nacional de Doñana. CSIC/ Agen Medio Ambiente, Sevilla.
- Costa, L.G., 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* 366, 1-13.
- Cyglar, M., Schrag, J.D., Sussman, J.L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M.K., Doctor, B.P., 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related enzymes. *Prot. Sci.* 2, 366-382.
- Chambers, J.E., Carr, R.L., 1995. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. *Toxicology* 105, 291-304.
- Chambers, J.E., Levi, P.E., 1992. Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects.
- Darvesh, S., Hopkins, D.A., 2003. Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *J Comp Neurol* 463, 25-43.
- de Almeida, E.A., Miyamoto, S., Bairy, A.C., de Medeiros, M.H., Di Mascio, P., 2004. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Mar Pollut Bull* 49, 386-392.

- De La Vega Salazar, M.Y., Tabche, L.M., Garcia, C.M.,** 1997. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramirez dam in Mexico. *Ecotoxicol Environ Saf* 38, 53-62.
- DeMaster, E.G., Redfern, B., Shiota, F.N., Nagasawa, H.T.,** 1986. Differential inhibition of rat tissue catalase by cyanamide. *Biochem Pharmacol* 35, 2081-2085.
- Dhara, V.R., Dhara, R.,** 2002. The Union Carbide disaster in Bhopal: a review of health effects. *Arch Environ Health* 57, 391-404.
- Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M., Guilhermino, L.,** 2003. Characterization of cholinesterases from *Daphnia magna* straus and their inhibition by zinc. *Bull Environ Contam Toxicol* 71, 219-225.
- Dowling, V.A., Sheehan, D.,** 2006. Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics* 6, 5597-5604.
- Dowsey, A.W., Dunn, M.J., Yang, G.Z.,** 2003. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 3, 1567-1596.
- Duquesne, S., Reynaldi, S., Liess, M.,** 2006. Effects of the organophosphate paraoxon-methyl on survival and reproduction of *Daphnia magna*: importance of exposure duration and recovery. *Environ Toxicol Chem* 25, 1196-1199.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Feather-Stone, R.M.,** 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7, 88-95.
- Escartin, E., Porte, C.,** 1996. Acetylcholinesterase inhibition in the crayfish *Procambarus clarkii* exposed to fenitrothion. *Ecotoxicol Environ Saf* 34, 160-164.
- Escartín, E., Porte, C.,** 1996. Bioaccumulation, metabolism and biochemical effects of the organophosphorus pesticide fenitrothion in *Procambarus clarkii*. *Environ Toxicol Chem* 15, 915-920.
- Fernandes, D., Potrykus, J., Morsiani, C., Raldua, D., Lavado, R., Porte, C.,** 2002. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality in two low-stream rivers (NE Spain). *Environ Res* 90, 169-178.
- Fernández, J.A.,** 1982. Guia de campo del Parque Nacional de Doñana. Omega, Barcelona.
- Ferrari, A., Venturino, A., de D'Angelo, A.M.,** 2004. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol Environ Saf* 57, 420-425.
- Fey, S.J., Larsen, P.M.,** 2001. 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis. *Curr Opin Chem Biol* 5, 26-33.
- Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M.,** 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci Total Environ* 317, 207-233.
- Flohé, L., Günzler, W.,** 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105, 114-121.
- Frova, C.,** 2006. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol Eng* 23, 149-169.
- Fujioka, K., Casida, J.E.,** 2007. Glutathione S-transferase conjugation of organophosphorus pesticides yields S-phospho-, S-aryl-, and S-alkylglutathione derivatives. *Chem Res Toxicol* 20, 1211-1217.
- Fuortes, L.J., Ayebo, A.D., Kross, B.C.,** 1993. Cholinesterase-inhibiting insecticide toxicity. *Am Fam Physician* 47, 1613-1620.
- Furihata, T., Hosokawa, M., Koyano, N., Nakamura, T., Satoh, T., Chiba, K.,** 2004. Identification of di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced carboxylesterase 1 in C57BL/6 mouse liver microsomes: purification, cDNA cloning, and baculovirus-mediated expression. *Drug Metab Dispos* 32, 1170-1177.
- Galgani, F., Bocquene, G.,** 1990. In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bull Environ Contam Toxicol* 45, 243-249.
- Galloway, T.S., Sanger, R.C., Smith, K.L., Fillmann, G., Readman, J.W., Ford, T.E., Depledge, M.H.,** 2002. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environ Sci Technol* 36, 2219-2226.
- Gebel, T.,** 2000. Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology* 144, 155-162.
- Goksoyr, A.,** 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol Suppl* 17, 80-95.

- Goldman, L.R., Smith, D.F., Neutra, R.R., Saunders, L.D., Pond, E.M., Stratton, J., Waller, K., Jackson, R.J., Kizer, K.W., 1990. Pesticide food poisoning from contaminated watermelons in California, 1985. *Arch Environ Health* 45, 229-236.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053.
- Gorg, A., Weiss, W., Dunn, M.J., 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665-3685.
- Gowland, B., Moffat, C., Stagg, R., Houlihan, D., Davies, I., 2002. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res* 54, 169-177.
- Grandjean, P., Brown, S.S., Reavey, P., Young, D.S., 1994. Biomarkers of chemical exposure: state of the art. *Clin. Chem.* 40, 1360-1362.
- Grimalt, J.O., Ferrer, M., Macpherson, E., 1999. The mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci Total Environ* 242, 3-11.
- Grøsvik, B.E., Larsen, H.E., Goksoyr, A., 1997. Effects of piperonyl butoxide and β -naphthoflavone on cytochrome P4501A expression and activity in Atlantic salmon (*Salmon salar L.*). *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 415-423.
- Guilhermino, L., Lacerda, M.N., Nogueira, A.J., Soares, A.M., 2000. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Sci Total Environ* 247, 137-141.
- Gutierrez-Yurrita, P.J., Montes, C., 1998. Environmental factors controlling the crayfish *Procambarus clarkii* activity in Doñana National Park temporary freshwater marsh, SW Spain. *Comp Biochem Physiol A* 120, 713-721.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15, 129-135.
- Gygi, S.P., Aebersold, R., 1999. Absolute quantitation of 2-D protein spots. *Methods Mol Biol* 112, 417-421.
- Gygi, S.P., Aebersold, R., 2000. Mass spectrometry and proteomics. *Curr Opin Chem Biol* 4, 489-494.
- Habig, C., Di Giulio, R.T., 1991. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. , in: P., I.M. (Ed.), *Cholinesterase Inhibiting Insecticides*. Elsevier, Amsterdam, pp. 19-33.
- Habig, C., Di Giulio, R.T., Abou-Donia, M.B., 1988. Comparative properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue crab (*Callinectes sapidus*) acetylcholinesterases. *Comp Biochem Physiol C* 91, 293-300.
- Habig, W., Pabst, M., Jakoby, W., 1974. Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249, 7130-7139.
- Habsburgo-Lorena, A.S., 1986. The status of the *Procambarus clarkii* population in Spain. *Freshwater Crayfish* 6, 131-136.
- Hagger, J.A., Depledge, M.H., Galloway, T.S., 2005. Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar Pollut Bull* 51, 811-816.
- Hamers, T., van den Brink, P.J., Mos, L., van der Linden, S.C., Legler, J., Koeman, J.H., Murk, A.J., 2003. Estrogenic and esterase-inhibiting potency in rainwater in relation to pesticide concentrations, sampling season and location. *Environ Pollut* 123, 47-65.
- Hansen, L.G., Shane, B.S., 1994. Xenobiotic metabolism. *Basic environmental toxicology*. Florida, Cockerham, L.G., Shane, B.S., 49-109.
- Harel, M., Sussman, J.L., Krejci, E., Bon, S., Chanal, P., Massoulié, J., 1992. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase, modeling and mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10827-10831.
- Hodgson, E., 2004. *A Textbook of Modern Toxicology*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- Homola, E., Chang, E.S., 1997. Distribution and regulation of esterases that hydrolyze methyl farnesoate in *Homarus americanus* and other crustaceans. *Gen Comp Endocrinol* 106, 62-72.
- Huang, X., Pedersen, T., Fischer, M., White, R., Young, T.M., 2004. Herbicide runoff along highways. 2. Sorption control. *Environ Sci Technol* 38, 3272-3278.

- Hunter, J., Maxwell, J.D., Stewart, D.A., Williams, R., Robinson, J., Richardson, A., 1972. Increased hepatic microsomal enzyme activity from occupational exposure to certain organochlorine pesticides. *Nature* 237, 399-401.
- Hyne, R.V., Maher, W.A., 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol Environ Saf* 54, 366-374.
- Ishizuka, M., Hoshi, H., Minamoto, N., Masuda, M., Kazusaka, A., Fujita, S., 1996. Alterations of cytochrome P450-dependent monooxygenase activities in *Eriocheir japonicus* in response to water pollution. *Environ Health Perspect* 104, 774-778.
- Ishizuka, M., Sakiyama, T., Iwata, H., Fukushima, M., Kazusaka, A., Fujita, S., 1998. Accumulation of halogenated aromatic hydrocarbons and activities of cytochrome P450 and glutathione S-transferase in crabs (*Eriocheir japonicus*) from Japanese rivers. *Environ Toxicol Chem* 17, 1490-1498.
- Jaganathan, L., Boopathy, R., 1998. Interaction of Triton X-100 with acyl pocket of butyrylcholinesterase: effect on esterase activity and inhibitor sensitivity of the enzyme. *Indian J Biochem Biophys* 35, 142-147.
- James, M.O., Boyle, S.M., 1998. Cytochromes P450 in crustacea. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 121, 157-172.
- Jensen-Holm, J., Lausen, H.H., Milthers, K., Moller, K.O., 1959. Determination of the cholinesterase activity in blood and organs by automatic titration; with some observations on serious errors of the method and remarks of the photometric determination. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 15, 384-394.
- Jensen, O.N., 2004. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* 8, 33-41.
- Johnson Rowsey, P., Gordon, C.J., 1997. Tolerance to the hypothermic and hyperthermic effects of chlorpyrifos. *Toxicology* 121, 215-221.
- Keiding, J., 1960. *The Insecticide DDT and its Significance*, Basel, Switzerland: Birkhauser AG, ed, Atlanta.
- Ketterer, B., 2001. A bird's eye view of the glutathione transferase field. *Chem Biol Interact* 138, 27-42.
- Kidd, D., Liu, Y., Cravatt, B.F., 2001. Profiling serine hydrolase activities in complex proteomes. *Biochemistry* 40, 4005-4015.
- Kidd, H., James, D.R., 1991. *The agrochemicals handbook*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry Information Services.
- Knigge, T., Monsinjon, T., Andersen, O.K., 2004. Surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry approach to biomarker discovery in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals under field conditions. *Proteomics* 4, 2722-2727.
- Kovarik, Z., Radic, Z., Berman, H.A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E., Taylor, P., 2003. Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *Biochem. J.* 373, 33-40
- Kruk, I., 1998. *Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species*. Berlin, Springer-Verlag.
- Kunz, S.E., Kemp, D.H., 1994. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev Sci Tech* 13, 1249-1286.
- Kutty, K.M., Payne, R.H., 1994. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. *J Clin Lab Anal* 8, 247-250.
- Kwong, T.C., 2002. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther Drug Monit* 24, 144-149.
- LaBaer, J., Ramachandran, N., 2005. Protein microarrays as tools for functional proteomics. *Curr Opin Chem Biol* 9, 14-19.
- Lanne, B., Panfilov, O., 2005. Protein staining influences the quality of mass spectra obtained by peptide mass fingerprinting after separation on 2-d gels. A comparison of staining with coomassie brilliant blue and sypro ruby. *J Proteome Res* 4, 175-179.
- Li, H., Schopfer, L., Spaulding, R., Thompson, C.M., Lockridge, O., 2005. Identification of organophosphate-reactive proteins by tandem mass spectrometry. *Chem Biol Interact* 157-158, 383-384.

- Liebler, D.C.**, 2002. Proteomic approaches to characterize protein modifications: new tools to study the effects of environmental exposures. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 1, 3-9.
- Lilley, K.S., Friedman, D.B.**, 2004. All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Rev Proteomics* 1, 401-409.
- Lindstrom-Seppa, P., Hanninen, O.**, 1986. Induction of cytochrome P-450 mediated mono-oxygenase reactions and conjugation activities in freshwater crayfish (*Astacus astacus*). *Arch Toxicol Suppl* 9, 374-377.
- Livingstone, D.R.**, 1992. Persist pollutants in marine invertebrates., *Persistent Pollutans in Marine Ecosystems*. Walker CH, Livingstone DR. Oxford, Pergamon Press: 3-34.
- Livingstone, D.R.**, 1993. Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molcular Biomarkers in the Aquatic Environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57, 195-211.
- Livingstone, D.R., Donkin, P., Walker, C.H.**, 1992. Pollutants in marine ecosystems: an overview., in: Walker CH, L.D. (Ed.), *Persistent Pollutants in Marine Ecosystems*. Pergamon Press, Oxford, pp. 235-263.
- Livingstone, D.R., Kirchin, M.A., Wiseman, A.**, 1989. Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in mollucs. *Xenobiotica* 19, 1041-1062.
- Lopez-Barea, J.**, 1995. Biomarkers in ecotoxicology: an overview, *Arch Toxicol Suppl* 17, pp. 57-79.
- Lopez-Barea, J., Gomez-Ariza, J.L.**, 2006. Environmental proteomics and metallomics. *Proteomics* 6 Suppl 1, S51-62.
- López-Barea, J., Pueyo, C.**, 1998. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutat Res* 399, 3-15.
- Lopez, M.F., Berggren, K., Chernokalskaya, E., Lazarev, A., Robinson, M., Patton, W.F.**, 2000. A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis* 21, 3673-3683.
- Lörh, G.W., Waller, H.D.**, 1974. *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer HU. New York, Academic Press II, 636.643.
- Lowe, W.R., Kendall, R.J.**, 1990. *Sentinel species and sentinel bioassay*. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Luo, C., Saxena, A., Smith, M., Garcia, G., Radic, Z., Taylor, P., Doctor, B.P.**, 1999. Phosphoryl oxime inhibition of acetylcholinesterase during oxime reactivation is prevented by edrophonium. *Biochemistry* 38, 9937-9947.
- Madigosky, S.R., Alvarez-Hernandez, X., Glass, J.**, 1991. Lead, cadmium, and aluminum accumulation in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* G. collected from roadside drainage ditches in Louisiana. *Arch Environ Contam Toxicol* 20, 253-258.
- Maines, M.D., Gibbs, P.E.**, 2005. 30 some years of heme oxygenase: from a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 568-577.
- Maki, T., Hosokawa, M., Satoh, T., Sato, K.**, 1991. Changes in carboxylesterase isoenzymes of rat liver microsomes during hepatocarcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 82, 800-806.
- Malins, D.C., Ostrander, G.K.**, 1991. Perspectives in aquatic toxicology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 31, 371-399.
- Manahan, S.E.**, 2000. *Environmental Chemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Mann, M., Pandey, A.**, 2001. Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases. *Trends Biochem Sci* 26, 54-61.
- Manzano, M.**, 1999. Los humedales de Doñana y su relación con el agua subterránea, in: Pérez-Miyares, F. (Ed.), 1ª Reunión Internacional de Expertos Sobre la Regeneración Hídrica de Doñana. Mº Medio Ambiente, Madrid, pp. 161-167.
- Marcel, V., Estrada-Mondaca, S., Magne, F., Stojan, J., Klæbe, A., Fournier, D.**, 2000. Exploration of the Drosophila acetylcholinesterase substrate activation site using a reversible inhibitor (Triton X-100) and mutated enzymes. *J Biol Chem* 275, 11603-11609.
- Marchini, S.**, 2002. Aquatic effects assessment: needs and tools. *Ann Ist Super Sanita* 38, 119-129.
- Marrs, T.C.**, 1993. Organophosphate poisoning. *Pharmacol Ther* 58, 51-66.
- Martin-Diaz, M.L., Tuberty, S.R., McKenney, C.L., Jr., Blasco, J., Sarasquete, C., Delvalls, T.A.**, 2006. The use of bioaccumulation, biomarkers and histopathology diseases in

- Procambarus clarkii* to establish bioavailability of Cd and Zn after a mining spill. Environ Monit Assess 116, 169-184.
- Martinez-Tabche, L., Ortega, M.D., Ramirez Mora, B., German Faz, C., Lopez Lopez, E., Galar Martinez, M.,** 2001. Hemoglobin concentration and acetylcholinesterase activity of oligochaetes in relation to lead concentration in spiked sediments from Ignacio Ramirez reservoir. Ecotoxicol Environ Saf 49, 76-83.
- Masson, H.J., Sams, C., Stevenson, A.J., Rawbone, R.,** 2000. Rates of spontaneous reactivation and aging of acetylcholinesterase in human erythrocytes after inhibition by organophosphorus pesticides. Hum Exp Toxicol 19, 511-516.
- Masson, P., Fortier, P.L., Albaret, C., Froment, M.T., Bartels, C.F., Lockridge, O.,** 1997. Aging of di-isopropyl-phosphorylated human butyrylcholinesterase. Biochem J 327 (Pt 2), 601-607.
- McDonagh, B., Tyther, R., Sheehan, D.,** 2005. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. Aquat Toxicol. 73, 315-326.
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R., Yu, H.,** 2000 Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. Environ Toxicol Chem 19, 2085-2092.
- Mentlein, R., Schumann, M., Heymann, E.,** 1984. Comparative chemical and immunological characterization of five lipolytic enzymes (carboxylesterases) from rat liver microsomes. Arch Biochem Biophys 234, 612-621.
- Mileson, B.E., Chambers, J.E., Chen, W.L., Dettbarn, W., Ehrich, M., Eldefrawi, A.T., Gaylor, D.W., Hamernik, K., Hodgson, E., Karczmar, A.G., Padilla, S., Pope, C.N., Richardson, R.J., Saunders, D.R., Sheets, L.P., Sultatos, L.G., Wallace, K.B.,** 1998. Common mechanism of toxicity: a case study of organophosphorus pesticides. Toxicol Sci 41, 8-20.
- Molloy, M.P.,** 2000. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. Anal Biochem 280, 1-10.
- Monserrat, J.M., Bianchini, A.,** 2000. Methodological and biological aspects to be considered in acetylcholinesterase reactivation assays using 2-PAM. Environ Toxicol Pharmacol 9, 39-47.
- Monserrat, J.M., Bianchini, A., Bairy, A.C.,** 2002. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. Mar Environ Res 54, 781-785.
- Monsinjon, T., Knigge, T.,** 2007. Proteomic applications in ecotoxicology. Proteomics 7, 2997-3009.
- Montes-Nieto, R., Fuentes-Almagro, C.A., Bonilla-Valverde, D., Prieto-Alamo, M.J., Jurado, J., Carrascal, M., Gomez-Ariza, J.L., Lopez-Barea, J., Pueyo, C.,** 2007. Proteomics in free-living *Mus spretus* to monitor terrestrial ecosystems. Proteomics 7, 4376-4387.
- Montforts, M.H.,** 2006. Assessment of persistency and bioaccumulation in pesticide registration frameworks within the Organization for Economic Cooperation and Development. Integr Environ Assess Manag 2, 13-21.
- Moody, M.W., Roberts, K.J., Huner, J.V.,** 1993. Phylogeny of commercially important seafood and description of the seafood industry. Clin Rev Allergy 11, 159-181.
- Mora, P., Fournier, D., Narbonne, J.F.,** 1999. Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Muller. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 122, 353-361.
- Mortz, E., Krogh, T.N., Vorum, H., Gorg, A.,** 2001. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. Proteomics 1, 1359-1363.
- Mosialou, E., Morgenstern, R.,** 1989. Activity of rat liver microsomal glutathione transferase toward products of lipid peroxidation and studies of the effect of inhibitors on glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. Arch Biochem Biophys 275, 289-294.
- Mumtaz, M.M., Tully, D.B., El-Masri, H.A., De Rosa, C.T.,** 2002. Gene induction studies and toxicity of chemical mixtures. Environ Health Perspect 110 Suppl 6, 947-956.
- Naik, R.S., Doctor, B.P., Saxena, A.,** 2008. Comparison of methods used for the determination of cholinesterase activity in whole blood. Chem Biol Interact.
- Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubeze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J.F., Moukrim, A.,** 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). Bull Environ Contam Toxicol 58, 901-908.

- Naqvi, S.M., Flagge, C.T., Hawkins, R.L.,** 1990. Arsenic uptake and depuration by red crayfish, *Procambarus clarkii*, exposed to various concentrations of monosodium methanearsonate (MSMA) herbicide. *Bull Environ Contam Toxicol* 45, 94-100.
- Nishihara, J.C., Champion, K.M.,** 2002. Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain. *Electrophoresis* 23, 2203-2215.
- Olson, D.L., Christensen, G.M.,** 1980. Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (*in vitro*). *Environ Res* 21, 327-335.
- O'Neill, A.J., Galloway, T.S., Browne, M.A., Dissanayake, A., Depledge, M.H.,** 2004. Evaluation of toxicity in tributaries of the Mersey estuary using the isopod *Asellus aquaticus* (L.). *Mar Environ Res* 58, 327-331.
- Okey, A.B.,** 1990. Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmacol Ther* 45, 241-298.
- Ong, S.E., Pandey, A.,** 2001. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng* 18, 195-205.
- Oñate, J.J., Pereira, D., Suarez, F.,** 2003. Strategic Environmental Assessment of the Effects of European Union's Regional Development Plans in Donana National Park (Spain). *Environ Manage* 31, 642-655.
- Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Ariel, N., Segall, Y., Velan, B., Shafferman, A.,** 1996. The architecture of human acetylcholinesterase active center probed by interactions with selected organophosphate inhibitors. *J Biol Chem* 271, 11953-11962.
- Ouaissi, A., Ouaissi, M., Sereno, D.,** 2002. Glutathione S-transferases and related proteins from pathogenic human parasites behave as immunomodulatory factors. *Immunol Lett* 81, 159-164.
- Patterson, S.D., Aebersold, R.H.,** 2003. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet* 33 Suppl, 311-323.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L.,** 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with new future? Field trials in association with two urban rivers and paper mill in Newfoundland. *Mar Pollut Bull* 32, 225-231.
- Peakall, D.,** 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol Ecotoxicol News* 1, 55-60.
- Pedrajas, J.R., Gavilanes, F., Lopez-Barea, J., Peinado, J.,** 1998. 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* 116, 1-17.
- Peshin, S.S., Lall, S.B., Gupta, S.K.,** 2002. Potential food contaminants and associated health risks. *Acta Pharmacol Sin* 23, 193-202.
- Pewnim, T., Seifert, J.,** 1993. Structural requirements for altering the L-tryptophan metabolism in mice by organophosphorous and methylcarbamate insecticides. *Eur J Pharmacol* 248, 237-241.
- Pope, C.N.,** 1999. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2, 161-181.
- Porrás Martín, J.N.L.-G., Pedro; Alvarez-Fernández, Ceferino; Fernández Uría, Antonio; Gimeno, María Victoria,** 1985. Calidad y Contaminación de las Aguas Subterráneas en España. Informe de Síntesis. IGME.
- Porte, C., Escartin, E.,** 1998. Cytochrome P450 system in the hepatopancreas of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*: a field study. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 121, 333-338.
- Quinn, D.M.,** 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition status. *Chem. Rev.* 87, 955 - 979.
- Ranganathan, S., Ciaccio, P.J., Tew, K.D.,** 1993. Principles of drug modulation applied to glutathione-S-transferases., in: Tew KD, P.C., Mantle Tj, Mannervik B, Hayes JD (Ed.), *Structure and Function of Glutathione Transferases*. Boca Raton, CRC Press, pp. 249-256.
- Regoli, F., Principato, G., Bertoli, E., Nigro, M., Orlando, E.,** 1997. Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium clobecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment. *Polar Biology* 17, 251-258.
- Reiner, E., Pavkovic, E., Radic, Z., Simeon, V.,** 1993. Differentiation of esterases reacting with organophosphorus compounds. *Chem.-Biol. Interactions* 87 77.
- Reiner, E., Radic, Z., Giacobini, E.,** 2000. Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors.

- Repetto, G., Sanz, P., Repetto, M.**, 1988. In vivo and in vitro effect of triclofon on esterases of the red crayfish *Procambarus clarkii*. Bull Environ Contam Toxicol 41, 597-603.
- Ringwood, A.H., Conners, D.E., Keppler, C.J.**, 1999. Cellular responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to metal contaminated sediments. Mar. Environ. Res. 48, 427-437. .
- Ritter, L., Solomon, K., Sibley, P., Hall, K., Keen, P., Mattu, G., Linton, B.**, 2002. Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry. J Toxicol Environ Health A 65, 1-142.
- Robillard, S., Beauchamp, G., Laulier, M.**, 2003. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 135, 49-59.
- Rodriguez-Ariza, A., Alhama, J., Diaz-Mendez, F.M., Lopez-Barea, J.**, 1999. Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of Sparus aurata fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. Mutat Res 438, 97-107.
- Rodriguez-Ortega, M.J., Grosvik, B.E., Rodriguez-Ariza, A., Goksoyr, A., Lopez-Barea, J.**, 2003. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. Proteomics 3, 1535-1543.
- Roesijadi, G.**, 1994. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. Environ Health Perspect 102 Suppl 12, 91-95.
- Romero-Ruiz, A., Carrascal, M., Alhama, J., Gomez-Ariza, J.L., Abian, J., Lopez-Barea, J.**, 2006. Utility of proteomics to assess pollutant response of clams from the Donana bank of Guadalquivir Estuary (SW Spain). Proteomics 6 Suppl 1, S245-255.
- Rosenfeld, C., Kousba, A., Sultatos, L.G.**, 2001. Interactions of rat brain acetylcholinesterase with the detergent Triton X-100 and the organophosphate paraoxon. Toxicol Sci 63, 208-213.
- Rotenberg, M., Shefi, M., Dany, S., Dore, I., Tirosh, M., Almog, S.**, 1995. Differentiation between organophosphate and carbamate poisoning. Clin Chim Acta 234, 11-21.
- Rousseaux, C.G., Dua, A.K.**, 1989. Pharmacology of HI-6, an H-series oxime. Can J Physiol Pharmacol 67, 1183-1189.
- Rueda, J., Camacho, A., Mezquita, F., Hernández, R., Roca, J.R.**, 2002. Effect of episodic and regular sewage discharges on the water chemistry and macroinvertebrate fauna of a Mediterranean stream. Water, Air and Soil Pollution 140, 425-444.
- Ruiz-Laguna, J., Gracia-Alfonso, C., Peinado, J., Moreno, S., Ieradi, L.A., Cistaldi, M., Lopez-Barea, J.**, 2001. Biochemical biomarkers of pollution in Algerian mouse (*Mus spretus*) to assess the effects of the Aznalcóllar disaster on Doñana Park (Spain). Biomarkers 6, 146-160.
- Ryter, S.W., Choi, A.M.**, 2005. Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. Antioxid Redox Signal 7, 80-91.
- Sanchez Hernandez, J.C., Sanchez, B.M.**, 2002. Lizard cholinesterases as biomarkers of pesticide exposure: enzymological characterization. Environ Toxicol Chem 21, 2319-2325.
- Sanchez, J.C., Fossi, M.C., Focardi, S.**, 1997. Serum "B" esterases as a nondestructive biomarker for monitoring the exposure of reptiles to organophosphorus insecticides. Ecotoxicol Environ Saf 38, 45-52.
- Sanz, P.M.R.**, 1995. Implicaciones toxicológicas de las enzimas colinesterasas, in: Díaz de Santos, M., España; Thompson HM, Walker CH. (Ed.), Toxicología Avanzada, pp. 117-147.
- Satoh, T., Hosokawa, M.**, 1998. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. Annu Rev Pharmacol Toxicol 38, 257-288.
- Satoh, T., Taylor, P., Bosron, W.F., Sanghani, S.P., Hosokawa, M., La Du, B.N.**, 2002. Current progress on esterases: from molecular structure to function. Drug Metab Dispos 30, 488-493.
- Saura, J., Bayán, B., Casas, J., Larramendi, A.R.d., Urdiales, C.**, 2001. Documento Marco para el Desarrollo del Proyecto Doñana 2005. Mº Medio Ambiente, Madrid.
- Schlenk, D.**, 1995. Use of aquatic organisms as models to determine the in vivo contribution of flavin-containing monooxygenases in xenobiotic biotransformation. Mol Mar Biol Biotechnol 4, 323-330.
- Scholz, N.L., Hopkins, W.A.**, 2006. Ecotoxicology of anticholinesterase pesticides: data gaps and research challenges. Environ Toxicol Chem 25, 1185-1186.
- Shafferman, A., Ordentlich, A., Barak, D., Stein, D., Ariel, N., Velan, B.**, 1996. Aging of phosphorylated human acetylcholinesterase: catalytic processes mediated by aromatic and polar residues of the active centre. Biochem J 318 (Pt 3), 833-840.

- Sheehan, D.**, 2006. Detection of redox-based modification in two-dimensional electrophoresis proteomic separations. *Biochem Biophys Res Commun* 349, 455-462.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A.**, 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360, 1-16.
- Sheehan, D., Power, A.**, 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 123, 193-199.
- Shepard, J.L., Olsson, B., Tedengren, M., Bradley, B.P.**, 2000. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Mar Environ Res* 50, 337-340.
- Shepard, J.L., Bradley, B.P.**, 2000. Protein expression signatures and lysosomal stability in *Mytilus edulis* exposed to graded copper concentrations. *Mar Environ Res* 50, 457-463.
- Shepard, J.L., Olsson, B., Tedengren, M., Bradley, B.P.**, 2000. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Mar Environ Res* 50, 337-340.
- Sies, H.**, 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl* 25, 1058-1071.
- Simpson, D.C., Smith, R.D.**, 2005. Combining capillary electrophoresis with mass spectrometry for applications in proteomics. *Electrophoresis* 26, 1291-1305.
- Smulders, C.J., Bueters, T.J., Vailati, S., van Kleef, R.G., Vijverberg, H.P.**, 2004. Block of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by organophosphate insecticides. *Toxicol Sci* 82, 545-554.
- Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H.**, 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat Toxicol* 67, 143-154.
- Sogorb, M.A., Vilanova, E.**, 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Lett* 128, 215-228.
- Solé, M., Porte, C., Albaigés, J.**, 1995. Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ Toxicol Chem* 14, 157-164.
- Song, X., Seidler, F.J., Saleh, J.L., Zhang, J., Padilla, S., Slotkin, T.A.**, 1997. Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicol Appl Pharmacol* 145, 158-174.
- Steinberg, C.E.W., Geyer, H.J., Kettrup, A.A.F.**, 1994. Evaluation of xenobiotic effects by ecological techniques. *Chemosphere* 28, 357-374.
- Stutz, H.**, 2005. Advances in the analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray-mass spectrometry detection. *Electrophoresis* 26, 1254-1290.
- Tabata, T., Katoh, M., Tokudome, S., Nakajima, M., Yokoi, T.**, 2004. Identification of the cytosolic carboxylesterase catalyzing the 5'-deoxy-5-fluorocytidine formation from capecitabine in human liver. *Drug Metab Dispos* 32, 1103-1110.
- Talbot, B.G., Anderson, D.R., Harris, L.W., Yarbrough, L.W., Lennox, W.J.**, 1988. A comparison of in vivo and in vitro rates of aging of soman-inhibited erythrocyte acetylcholinesterase in different animal species. *Drug Chem Toxicol* 11, 289-305.
- Taylor, P.**, 1998. Development of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease. *Neurology* 51, S30-35; discussion S65-37.
- Teschke, M., Saborowski, R.**, 2005. Cysteine proteinases substitute for serine proteinases in the midgut glands of *Crangon crangon* and *Crangon allmani* (Decapoda : Caridae). *J Exp Mar Biol Ecol* 316, 213-229.
- Thompson, C.M.**, 1992. Preparations, analysis, and toxicity of phosphorothionates., in: In Chambers JE, L.P. (Ed.), *Organophosphates: Chemistry, Fate, and Effects*. Academic Press, San Diego, pp. 19-46.
- Timbrell, J.**, 2001. Principles of Biochemical Toxicology. Taylor & Francis, London.
- Tomlin, C.**, 1997. The pesticide manual. British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, UK.
- Tovar-Sanchez, A., Huerta-Diaz, M.A., Negro, J.J., Bravo, M.A., Sanudo-Wilhelmy, S.A.**, 2005. Metal contamination in interstitial waters of Donana Park. *J Environ Manage*.

- Trevisan, M., Montepiani, C., Ragozza, L., Bartoletti, C., Ioannilli, E., Del Re, A.A.**, 1993. Pesticides in rainfall and air in Italy. *Environ Pollut* 80, 31-39.
- Tsigelny, I., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., Sudhof, T.C., Taylor, P.**, 2000. Common EF-hand motifs in cholinesterases and neurologins suggest a role for Ca²⁺ binding in cell surface associations. *Protein Sci* 9, 180-185.
- Valle, A.M., Radic, Z., Rana, B.K., Whitfield, J.B., O'Connor, D.T., Martin, N.G., Taylor, P.**, 2008. The cholinesterases: Analysis by pharmacogenomics in man. *Chem Biol Interact*.
- Van den Bergh, G., Arckens, L.**, 2004. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Curr Opin Biotechnol* 15, 38-43.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E.**, 2003 Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- Vellom, D.C., Radić, Z., Li, Y., Pickering, N.A., Camp, S., Taylor, P.**, 1993. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry* 32 12-17.
- Vihinen, M.**, 2001. Bioinformatics in proteomics. *Biomol Eng* 18, 241-248.
- Vioque-Fernandez, A., de Almeida, E.A., Ballesteros, J., Garcia-Barrera, T., Gomez-Ariza, J.L., Lopez-Barea, J.**, 2007a. Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicol Lett* 168, 260-268.
- Vioque-Fernandez, A., de Almeida, E.A., Lopez-Barea, J.**, 2007b. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145, 404-412.
- Vioque-Fernandez, A., de Almeida, E.A., Lopez-Barea, J.**, 2008 a. Biochemical and proteomic effects in *Procambarus clarkii* after chlorpyrifos or carbaryl exposure under sublethal conditions. Biomarkers, sometido.
- Vioque-Fernandez, A., de Almeida, E.A., Lopez-Barea, J.**, 2008 b. Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Sci of the Total Environ.*, sometido.
- Walker, C.H.**, 1989. The development of an improved system of nomenclature and classification of esterases Ellis Horwood, Chichester.
- Walker, C.H.**, 1998. The Use of Biomarkers to Measure the Interactive Effects of Chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf* 40, 65-70.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B.**, 1997. Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis, London.
- Walz, I., Schwack, W.**, 2007. Multienzyme inhibition assay for residue analysis of insecticidal organophosphates and carbamates. *J Agric Food Chem* 55, 10563-10571.
- Wang, H., Hanash, S.**, 2003. Multi-dimensional liquid phase based separations in proteomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 787, 11-18.
- Whitlock, J.P., Jr.**, 1999. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 103-125.
- Wilson, I.B., Ginsburg, B.**, 1955. A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta* 18, 168-170.
- Winston, G.W., Di giulio, R.T.**, 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicol* 19, 137.161.
- Winteringham, F.P.**, 1969. Mechanisms of selective insecticidal action. *Annu Rev Entomol* 14, 409-442.
- Wittke, S., Kaiser, T., Mischak, H.**, 2004. Differential polypeptide display: the search for the elusive target. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 803, 17-26.
- Wogram, J., Sturm, A., Segner, H., Liess, M.**, 2001. Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. *Environ Toxicol Chem* 20, 1528-1531.
- Worek, F., Kirchner, T., Backer, M., Szinicz, L.**, 1996. Reactivation by various oximes of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by different organophosphorus compounds. *Arch Toxicol* 70, 497-503.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P.**, 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta* 288, 73-90.

- Zatta, P., Ibn-Lkhat-Idrissi, M., Zambenedetti, P., Kilyen, M., Kiss, T.,** 2002. *In vivo* and *in vitro* effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase. *Brain Res Bull* 59, 41-45.
- Zhang, J., Burnell, J.C., Dumauval, N., Bosron, W.F.,** 1999. Binding and hydrolysis of meperidine by human liver carboxylesterase hCE-1. *J Pharmacol Exp Ther* 290, 314-318.
- Ziegler, D.M.,** 1988. Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. *Drug Metab Rev* 19, 1-32.

Índice

INTRODUCCIÓN

I. CONTAMINACIÓN DE LOS ECOSISTEMAS FLUVIALES

I.1 TIPOS DE CONTAMINANTES

I.2 PLAGUICIDAS

I.2.1 Organofosforados

I.2.2 Carbamatos

I.2.3 Organoclorados

I.2.4 Otros plaguicidas

II. BIOINDICADORES: *PROCAMBARUS CLARKII*

III. BIOMARCADORES

III.1 BIOTRANSFORMACIÓN DE XENOBIÓTICOS

III.1.1 Citocromos p450 y otras enzimas de fase I

III.1.2 Enzimas de fase II

III.2 ESTRÉS OXIDATIVO

III.2.1 Daños Oxidativos

III.2.2 Defensas celulares contra el estrés oxidativo

III.3 ESTERASAS

III.3.1 Colinesterasas

III.3.2 Carboxilesterasas

III.3.3 Reacción enzimática e inhibición por Ops y Cms

III.3.4 Medida de la actividad esterasa. Método Ellman

III.3.5 Reactivación y envejecimiento

III.3.6 Otras proteínas que interaccionan con Ops y Cms

III.4. PROTEÓMICA. ANÁLISIS PROTEÓMICO

III.4.1 Electroforesis bidimensional

III.4.2 Análisis de imágenes 2D

III.4.3 Identificación de proteínas

III.4.4 Aplicación de la proteómica a estudios de contaminación

IV. DOÑANA

IV.1 CONTAMINACIÓN EN DOÑANA

V. OBJETIVOS DEL TRABAJO

MATERIALES Y MÉTODOS

- I. ESTUDIOS DE CAMPO Y ÁREAS DE MUESTREO
- II. REACTIVOS
- III. EXPOSICIÓN *IN VIVO* A CLORPIRIFOS Y A CARBARIL
- IV. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS
 - IV. 1.- ACTIVIDADES ESTERASAS
 - IV. 1. 1.- Obtención de la extractos para determinar esterasas
 - IV. 1. 2.- Ensayos de Acetil- Butiril-colinesterasa y Carboxilesterasa
 - IV. 1. 3.- Sensibilidad de AChE, CbE y BChE a diferentes compuestos
 - IV. 1. 4.-Reactivación *in vitro* de AChE y CbE inhibidas por clorpirifos y carbaril
 - IV. 2.- OTRAS BIOMARCADORES
 - IV. 2. 1.- Obtención de extractos
 - IV. 2. 1. 1.- Obtención de extractos crudos de glándula digestiva
 - IV. 2. 1. 2.- Obtención de fracción microsomal
 - IV. 2. 1. 3.- Preparación de la muestra para determinar Metalotioneinas
 - IV.-2. 1. 4.- Preparación de la muestra para determinar glutatión(GSH/GSSG)
 - IV. 2. 2.- Determinación de otros biomarcadores
 - IV. 2. 2. 1.- Catalasa (EC 1.11.1.6)
 - IV. 2. 2. 2.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49)
 - IV. 2. 2. 3.- Glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9)
 - IV. 2. 2. 4.- Glutatión transferasa (EC 2.5.1.18)
 - IV. 2. 2. 5.- Glioxalasa II (EC 3.1.2.6)
 - IV. 2. 2. 6.- Etoxisresorrufina-O-desetilasa (EROD)
 - IV. 2. 2. 7.- Determinación de malondialdehido (MDA)
 - IV. 2. 2. 8.- Determinación de glutatión (GSH y GSSG)
 - IV. 2. 2. 9.- Determinación de Metalotioneinas (MTs)
 - IV. 3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA
- V. ANÁLISIS PROTEÓMICO
 - V. 1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES
 - V. 2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL
 - V. 3. TINCIÓN DE GELES
 - V. 4. ANÁLISIS DE IMAGEN DE LOS GELES
- VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

RESULTADOS

I. ESTERASAS COMO BIOMARCADORES DE PLAGUICIDAS EN *P.clarkii*:

DISTRIBUCIÓN TISULAR, SENSIBILIDAD A PLAGUICIDAS MODELO Y REACTIVACIÓN ENZIMÁTICA

I.1. OPTIMIZACIÓN DE LOS ENSAYOS Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA IN DIFERENTES TEJIDOS

I.2. EFECTO DEL TRITON X 100 EN LA SOLUBILIZACIÓN Y ENSAYO DE ESTERASAS

I.3. SENSIBILIDAD DE LAS ESTERASAS A PMSF E ISO-OMPA EN *P.clarkii*

I.4. SENSIBILIDAD DE LAS ESTERASAS DE *P.clarkii* A PLAGUICIDAS MODELO OPs Y CMs

I.5. REACTIVACIÓN DE ACHE Y CBE TRAS INHIBICIÓN CON PLAGUICIDAS OPs Y CMs.

II. PUESTA A PUNTO DE OTROS BIOMARCADORES EN *P.clarkii*

II.1 ENZIMAS ANTIOXIDATIVAS Y DESTOXIFICADORAS

II. 2 METALOTIONEINAS, MDA, GSH Y GSSG

III. PUESTA A PUNTO DE LOS GELES 2D EN VARIOS TEJIDOS DE *P.clarkii*

III.1. PROTEOMAS DE MÚSCULO, TEJIDO NERVIOSO Y GLÁNDULAS DIGESTIVA EN GELES 7CM.

III.2. PROTEOMAS DE MÚSCULO, T.J. NERVIOSO, GL. DIGESTIVA Y BRANQUIAS, GELES 18 CM.

IV. EFECTOS BIOQUÍMICOS Y PROTEÓMICOS TRAS EXPONER *P.clarkii* A CLORPIRIFOS (OP) Y A CARBARIL (CM).

IV.1. EFECTO IN VIVO DEL CLORPIRIFOS Y DEL CARBARIL SOBRE LAS ESTERASAS DE *P.clarkii*

IV.2. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN IN VIVO A CLORPIRIFOS Y CARBARIL SOBRE BIOMARCADORES CONVENCIONALES DE CONTAMINACIÓN

IV.3. ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA EN *P.clarkii* EXPUESTOS A CLORPIRIFOS Y CARBARIL

V. ANÁLISIS DE LA CONTAMINACIÓN DEL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA EN *P.clarkii*: INTEGRACIÓN DE LAS RESPUESTAS DE UNA BATERÍA DE BIOMARCADORES CONVENCIONALES Y DE LA APROXIMACIÓN PROTEÓMICA.

V.1. NIVELES DE PLAGUICIDAS Y METALES EN EL PND

V.2. RESPUESTA DE LAS ESTERASAS DE CANGREJOS DEL PND

V.3. RESPUESTA DE OTROS BIOMARCADORES CONVENCIONALES EN CANGREJOS DEL PND

V.4. ALTERACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN PROTEICA EN CANGREJOS DEL PND

DISCUSIÓN

I. ESTERASAS COMO BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN *P.clarkii*

I.1. EL TRITON X-100 NO ES APROPIADO PARA LA EXTRACCIÓN Y ENSAYO DE ESTERASAS EN *P.clarkii*

I.2.SENSIBILIDAD DE LAS ESTERASAS A INHIBIDORES Y PLAGUICIDAS EN *P.clarkii*

I.3.RECUPERACIÓN DE LAS ESTERASAS INHIBIDAS POR PLAGUICIDAS EN *P.clarkii*

I.4.RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE CONTAMINANTES Y LA INHIBICIÓN DE LAS ESTERASAS EN *P.clarkii* DE DOÑANA

II. EFECTOS BIOQUÍMICOS Y PROTEOMICOS IN *P.clarkii* TRAS LA EXPOSICIÓN A CONCENTRACIONES SUBLETALES DE CLORPIRIFOS Y CARBARIL

II.1.RESPUESTA DE LAS ESTERASAS Y OTROS MEDIDA BIOMARCADORES CONVENCIONALES

II.2.UTILIDAD DE LA APROXIMACIÓN PROTEOMIA COMO MEDIDA DE LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN *P.clarkii*

III. EVALUACIÓN DEL LA CONTAMINACIÓN DEL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA *P.clarkii*: INTEGRACIÓN DE BIOMARCADORES CONVENCIONALES Y EFECTOS PROTEOMICOS

III.1.MEDIDA DE LA CONTAMINACIÓN USANDO BIOMARCADORES CONVENCIONALES

III.2.LA PROTEOMICA AMBIENTAL COMO MEDIDA DE LA CONTAMINACIÓN

III.3.INTEGRACIÓN DE LOS BIOMARCADORES CONVENCIONALES Y LA APROXIMACIÓN PROTEOMICA

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA