

Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vílchez
Martín”



**Uso combinado de metodologías –ómicas en organismos
modelo para el estudio de la contaminación ambiental**

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

Gema Rodríguez Moro

Fecha de lectura: 17 de junio de 2019

Bajo la dirección de los doctores:

Tamara García Barrera

José Luis Gómez Ariza

Huelva, 2019



Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vilchez Martín”



**Uso combinado de metodologías -ómicas en organismos
modelo para el estudio de la contaminación ambiental**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Gema Rodríguez Moro

Bajo la dirección de los doctores:

Tamara García Barrera

José Luis Gómez Ariza

Huelva, 2019

Universidad de Huelva

Departamento de Química "Profesor José Carlos Vilchez Martín"



Uso combinado de metodologías -ómicas en organismos modelo para el estudio de la contaminación ambiental

Programa de Doctorado:

Ciencia y Tecnología Industrial y Ambiental

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Gema Rodríguez Moro

Fdo.: Gema Rodríguez Moro

Bajo la dirección de los doctores:

Tamara García Barrera

José Luis Gómez Ariza

Fdo. Dra. Tamara García Barrera

Fdo.: Dr. José Luis Gómez Ariza

Huelva, 2019

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a mis Directores de Tesis, José Luis Gómez Ariza y Tamara García Barrera por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar en el grupo de Investigación Análisis Medioambiental y Bioanálisis. Gracias por vuestros consejos y apoyo en los momentos difíciles.

Agradezco al Ministerio de Economía y Competitividad por la concesión de una beca de personal investigador en formación, ya que sin este medio de financiación no hubiera sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A mis compañeros de laboratorio, tanto aquellos que me ayudaron en el inicio de este largo camino transmitiéndome sus conocimientos, Miguel Ángel García, Raúl González, Verónica Gómez, Rocío Jara, Macarena González, Francisco Navarro; como los que me brindaron su apoyo día tras día en el transcurso de esta tesis, ya que gracias al compañerismo y apoyo moral han aportado un alto porcentaje a mis ganas de seguir adelante en este largo camino: Ana Arias, Paqui Arellano, Sara Ramírez, Rocío Baya, Manuel Contreras, Adrián Rodríguez, Antonio Domínguez, Daniel Barrios. Por último, quisiera hacer especial alusión a Belén Callejón, gracias por aguantar mis malos y buenos momentos, por apoyarme y estar pendiente de mis necesidades en cada momento, has sido una buena compañera tanto dentro como fuera del laboratorio. Es cierto amiga, no ha sido nada fácil, ni mucho menos, sin embargo, gracias a tu ayuda, esto ha parecido menos complicado. Gracias por tu amistad verdadera, eres especial. Y recuerda siempre: “de perdíos, al río”.

También quisiera expresar mi agradecimiento a mis tutores del grupo Bioscope de la Universidad Nova de Lisboa, José Luis Capelo, Carlos Lodeiro y Hugo Santos, así como a mis compañeros de laboratorio, por hacerme sentir una más durante mi estancia de investigación; en especial a Adrián Lodeiro.

Muchas gracias también a mis compañeros de la carrera Licenciatura Química: Macarena Corro, mi compi especial; Jesús Algaba, Jesús Ángel Gómez, Cristina García, Mauricio Lineros, Manuel Márquez, María Millán, aunque fueron cinco años muy difíciles entre apuntes y exámenes, ellos han conseguido que mis mejores recuerdos sean los momentos de risas junto a ellos. La pasión por la química nos unió y la amistad que forjamos durará para siempre.

A mi familia, porque siempre ha creído en mí. A mi tito Manolito. A mis tías Isabel y Magdalena, por considerarme siempre una más en vuestro núcleo familiar; a mis primos: Juan Manuel, M^a Ángeles, Desirée y Eva María, por estar tan unidos desde pequeños, siempre os he considerado como mis hermanos. También a sus parejas Lorena y Sebastián. Gracias por vuestro apoyo incondicional y preocupación en los momentos más difíciles, animándome siempre a seguir adelante. Gracias a las últimas personitas que han llegado a mi vida, mis sobrinas Candela y Paula, las que con solo una sonrisa me alegran los malos momentos.

Y de repente surgió el amor, Juan Mesa. Lo nuestro fue tan inesperado, que nos encontramos sin buscarnos. Tu ayuda ha sido fundamental en el último tramo de este largo camino profesional. Gracias por creer en mi capacidad, has estado conmigo motivándome, ayudándome y apoyándome cada día para superarme más. Te lo agradezco muchísimo, amor.

Quiero dedicar mis últimas palabras a la persona más importante de mi vida, mi madre. Gracias por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad. Gracias por guiarme en todos mis caminos y por esforzarte tanto para que hoy pudiera estar escribiendo estas palabras. Muchos de mis logros, entre los que se incluye esta tesis, se lo debo a ella. Me educó con algunas reglas pero también con muchas libertades y me motivó constantemente para alcanzar mis metas. En memoria de Rafael, él siempre me apoyó, aunque ya no este entre nosotras estoy segura que estarías muy orgulloso de mí en estos momentos. GRACIAS infinitas.

A mi madre

*“Pregúntate si lo que estás haciendo hoy, te llevará a
dónde quieres llegar mañana”*

Walt Disney

ÍNDICE

Index



ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS/ INDEX OF ABBREVIATIONS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS/INDEX OF FIGURES	xi
ÍNDICE DE TABLAS/INDEX OF TABLES.....	xiii
1. RESUMEN / SUMMARY	3
2. INTRODUCCIÓN / INTRODUCTION	9
2.1. Los elementos en el medio ambiente	11
2.1.1. Toxicidad y esencialidad de los elementos químicos.....	11
2.1.2. La problemática de la contaminación ambiental y su diagnóstico	14
2.1.3. Interacciones biológicas entre elementos: el papel del selenio como antagonista.....	19
2.1.4. Monitorización de la contaminación. Bioindicadores.....	27
2.1.5. Monitorización de los efectos biológicos. Biomarcadores.....	34
2.2. Técnicas de análisis masivo. Metodologías ómicas	41
2.2.1. Metodologías ómicas para estudios ambientales	43
2.2.2. Metalómica y especiación química	47
2.2.3. Proteómica.....	55
2.2.4. Metabolómica.....	57
2.2.5. Ionómica. Homeostasis de metales	62
2.3. El papel de la espectrometría de masas en las ómicas.....	64
2.3.1. Espectrometría de masas para análisis multielemental	69
2.3.2. Espectrometría de masas para estudios proteómicos	75
2.3.3. Espectrometría de masas molecular para estudios metabolómicos ..	78
2.3.4. Técnicas de separación cromatográfica para estudios metalómicos y de especiación química	83
2.4. Referencias.....	89
3. OBJETIVOS / OBJECTIVES	121
4. PARTE EXPERIMENTAL / EXPERIMENTAL SECTION	127
4.1. Instrumentación empleada para la preparación de muestras.....	127

4.2.	Instrumentación empleada en el análisis de muestras	128
4.3.	Experiencias con organismos modelo	129
4.3.1.	Experiencias de exposición en ratones.....	129
4.3.2.	Experiencias de exposición a As en el bivalvo <i>Scrobicularia plana</i>	133
4.3.3.	Muestreo del bivalvo <i>Scrobicularia plana</i> en el estuario del Río Guadalquivir.	134
4.4.	Procedimientos analíticos para análisis multielemental.....	136
4.4.1.	Preparación de muestras para análisis multielemental.....	136
4.4.2.	Análisis multielemental mediante ICP-ORS-MS	136
4.5.	Procedimientos analíticos para especiación química	137
4.5.1.	Preparación de muestras para especiación de arsénico	137
4.5.2.	Análisis de especies de arsénico mediante AEC-ICP-MS	138
4.6.	Procedimientos analíticos para estudios metabolómicos	138
4.6.1.	Preparación de extractos de tejidos biológicos.....	139
4.6.2.	Preparación de extractos de suero	139
4.6.3.	Análisis metabolómico mediante DI-ESI-QqQ-TOF-MS	140
4.6.4.	Análisis metabolómico mediante GC-MS.....	140
4.6.5.	Procesamiento de datos	141
4.6.6.	Análisis estadístico de los resultados	142
4.7.	Procedimientos analíticos para estudios proteómicos.....	143
4.7.1.	Preparación de muestras para estudios proteómicos.....	143
4.7.2.	Análisis proteómico mediante nanoLC-ESI-TOF-MS/MS	144
4.8.	Referencias.....	145
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN / RESULTS AND DISCUSSION.....	149
	CAPÍTULO 1 /CHAPTER 1	151
1.1	Combination of HPLC with organic and inorganic mass spectrometry to study the metabolic response of the clam <i>Scrobicularia plana</i> to arsenic exposure.....	153
1.2	Metabolomic study of <i>Scrobicularia plana</i> based on organic mass spectrometry for environmental stress assessment.	153
	CAPÍTULO 2 / CHAPTER 2	187

2.1. Metabolic impairments, metals traffic and dyshomeostasis caused by the antagonistic interaction of cadmium and selenium using organic and inorganic mass spectrometry.....	189
2.2. Metabolic impairments caused by “chemical cocktails” in mammals using direct infusion triple quadrupole time of flight and gas chromatography mass spectrometry.....	219
CAPÍTULO 3 / CHAPTER 3	249
3.1. Proteomic signatures in the biological response of <i>Mus musculus</i> mice against metals and the antagonistic interaction with selenium	253
6.CONCLUSIONES	295

ÍNDICE DE ABREVIATURAS/ INDEX OF ABBREVIATIONS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
ANOVA	Análisis de varianza	Analysis of variance
APCI	Ionización química a presión atmosférica	Chemical ionization at atmospheric pressure
APPI	Fotoionización a presión atmosférica	Atmospheric pressure photoionization
ARN	Ácido ribonucleico	Ribonucleic acid
AsB	Arsenobetaina	Arsenobetaine
AsC	Arsenocolina	Arsenocholine
ATP	Adenosina trifosfato	Adenosine triphosphate
CI	Ionización química	Chemical ionization
DDE	Dicloro difenil dicloroetileno	Dichlorodiphenyldichloroethylene
DDT	Dicloro difenil tricloroetano	Dichloro diphenyl trichloroethane
DI	Infusión directa	Direct infusion
DMA	Ácido dimetilarsínico	Dimethylarsinic acid
EC	Electroforesis capilar	Capillary electrophoresis
EI	Impacto electrónico	Electronic impact
EM	Electromultiplicador	Electromultiplier
ESI	Ionización por electrospray	Electrospray ionization
<i>et al.</i>	<i>y colaboradores</i>	<i>et alii</i>
FFAS	Espectroscopía de absorción atómica de llama	Flame Atomic Absorption Spectroscopy
FM	Fotomultiplicador	Photomultiplier
FT	Transformada de Fourier	Fourier transform
GC	Cromatografía de gases	Gas chromatography
GE	Electroforesis en gel	Gel electrophoresis
GPx1	Glutatión peroxidasa	Glutathione peroxidase 1
GSH	Glutatión reducido	Reduced glutathione
HG-AFS	Espectroscopía de fluorescencia atómica con generación de hidruros	Hydride generation atomic fluorescence spectrometry
HILIC	Cromatografía líquida de interacción hidrofílica	Hydrophilic interaction chromatography
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución	High performance liquid chromatography

ICP-MS	Espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado	Inductively-coupled plasma mass spectrometry
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica con fuente de acoplamiento inductivo	Inductively coupled plasma optic emission spectrometry
ICR	Resonancia ciclotrónica de iones	Ion cyclotron resonance
IEC	Cromatografía de intercambia iónico	Ion exchange chromatography
IEF	Isoelectroenfoque	Isoelectric focusing
IT	Trampa de iones	Ion trap
LC	Cromatografía líquida de alta resolución	Liquid chromatography
m/z	masa/carga	mass/charge
MALDI	Ionización/desorción láser asistida por matriz	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MMA	Ácido monometilarsónico	Monomethylarsonic acid
MOA	Modo de acción	Action mode
MS	Espectrometría de masas	Mass spectrometry
MSI	Metabolomics Standars Initiative	Metabolomics Standars Initiative
MSTFA	N-metil-N (trimetilsilil) - trifluoroacetamida	N-methyl-N (trimethylsilyl) - trifluoroacetamide
MTs	Metalotioneínas	Metallothioneins
MW	Masa molecular	Molecular weight
nESI	Ionización por nano-electrospray	Nanoelectrospray ionization
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología	National Institute of Standards and Technology
OMS	Organización Mundial de Salud	World Health Organization
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PCA	Análisis de componentes principales	Principal component analysis
PCBs	Compuestos bifenilos policlorados	Polychlorinated biphenyls compounds
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales	Partial least squares discriminant analysis
Q	Cuadrupolo	Quadrupole
RMN	Resonancia Magnética Nuclear	Nuclear magnetic resonance
ROS	Especies de oxígeno reactivo	Reactive oxygen species
RPC	Cromatografía de fase reversa	Reversed phase chromatography

SDS	Dodecilsulfato sódico	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño	Size exclusion chromatography
SOD	Superóxido dismutasa	Superoxide dismutase
TeMA	Ión tetrametilarsonio	Tetramethylarsonium ion
TMAO	Óxido de trimetilarsina	Trimethylarsine Oxide
TOF	Tiempo de vuelo	Time of flight
HMDB	Human metabolome database	Human metabolome database

ÍNDICE DE FIGURAS/INDEX OF FIGURES

Figura 1. Concentración y respuesta de elementos. Relación entre la concentración y respuesta para elementos esenciales y tóxicos.

Figura 2. Ciclos biogeoquímicos de los metales pesados.

Figura 3. Principales tipos de contaminación y sus fuentes.

Figura 4. Ciclos homeostáticos y cambios metabólicos de los elementos causados por contaminantes.

Figura 5. Representación gráfica de los mecanismos de protección del selenio frente a la toxicidad de elementos no esenciales.

Figura 6. Ratón de vida libre *Mus spretus* y ratón de laboratorio *Mus musculus*.

Figura 7. Bivalvo *Scrobicularia plana*.

Figura 8. Diferentes niveles de riesgo al que puede estar sometido un organismo en el medio ambiente.

Figura 9. Parámetros utilizados como biomarcadores de estrés medioambiental.

Figura 10. Representación esquemática de la cascada de las “-ómicas”.

Figura 11. Esquema de trabajo típico que se aplica en los estudios ómicos medioambientales.

Figura 12. Representación esquemática de las biomoléculas que contienen un heteroelemento endógeno

Figura 13. Estructura de los compuestos de As más abundante en la naturaleza.

Figura 14. Representación esquemática de los diferentes enfoques metabolómicos.

Figura 15. Configuración básica de un espectrómetro de masas.

Figura 16. Características de las diferentes técnicas analíticas elementales.

Figura 17. Representación esquemática de un equipo de ICP-ORS-MS.

Figura 18. Representación esquemática de las técnicas híbridas utilizadas para el estudio de metalobiomoléculas en los fluidos biológicos.

Figura 19. Accesorios empleados para los experimentos de exposición por vía subcutánea y vía oral.

Figura 20. Experiencia de exposición a Cd y Se en ratones *Mus Musculus*.

Figura 21. Experiencia de exposición a DDE y Se en ratones *Mus Spretus*.

Figura 22. Experiencia de exposición a cóctel de metales (As, Cd y Hg) y Se en ratones *Mus musculus*.

Figura 23. Experiencia de exposición a As en el bivalvo *Scrobicularia plana*.

Figura 24. Área de muestreo en el estuario del río Guadalquivir (suroeste de España);
Sitio 1: “Brazo de la Torre”-BLT (punto rojo); *Sitio 2:* “La Pantoca”-PAN (punto verde).

ÍNDICE DE TABLAS/INDEX OF TABLES

Tabla 1. Ejemplos de biomarcadores usados para la biomonitorización medioambiental.

Tabla 2. Ventajas y limitaciones de los biomarcadores.

Tabla 3. Características de los biomarcadores y los bioindicadores.

Tabla 4. Valores experimentales de LD₅₀ para diferentes especies de As.

Tabla 5. Condiciones operacionales óptimas para análisis multielemental por ICP-MS.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas optimizadas para la especiación de arsénico mediante AEC-ICP-MS.

Tabla 7. Condiciones operacionales para el estudio metabolómico por DI-ESI-QqQ-TOF-MS.

Tabla 8. Condiciones operacionales para el estudio metabolómico por GC-MS.

1. RESUMEN

Summary



1. RESUMEN

El aumento cada vez más importante de una gran variedad de contaminantes químicos en el medio ambiente supone un riesgo para la salud de los organismos que habitan en él y los correspondientes ecosistemas. Los estudios de monitorización medioambiental de los ecosistemas se llevan a cabo mediante análisis químico de contaminantes convencionales como los metales (por ejemplo, Cd, As, Pb, Hg, etc.), contaminantes orgánicos (p.ej. plaguicidas, PCBs, PAHs), y contaminantes emergentes (p.ej. disruptores endocrinos, productos farmacéuticos, productos para el cuidado de la salud y detergentes) y, más recientemente, las nanopartículas. Sin embargo, estos análisis químicos tradicionales no permiten conocer el efecto que los contaminantes químicos presentes en el medio ambiente provocan sobre los organismos. Por ello, en los últimos años se han desarrollado una serie de metodologías que permiten evaluar la respuesta biológica de determinados organismos utilizados como bioindicadores de contaminación ambiental, ya que estos reflejan el efecto de los contaminantes sobre el metabolismo celular y la homeostasis global. Entre estas metodologías se encuentran el uso de biomarcadores, que se definen como parámetros bioquímicos medidos en los organismos expuestos (bioindicadores) los cuales permiten identificar, al alterarse sus niveles, la presencia de factores externos de riesgo, como por ejemplo: la presencia de sustancias tóxicas, sus efectos biológicos o los riesgos de su presencia en los ecosistemas. Además, esta respuesta puede evaluarse mediante experiencias, con bioindicadores de vida libre, que integren los procesos de sinergismo/antagonismo entre contaminantes y la interacción con sustancias de los ecosistemas, o de laboratorio, que permitan el estudio aislado del efecto de uno o más contaminantes seleccionados.

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han llevado a cabo diferentes estudios *-ómicos* para la búsqueda de biomarcadores de estrés medioambiental, tanto en organismos que habitan en sistemas estuáricos, como el bivalvo

Scrobicularia plana; u organismos del medio terrestre, como el ratón de vida libre *Mus spretus*, y su equivalente genético el ratón de laboratorio *Mus Musculus*.

Entre los experimentos de exposición llevados a cabo durante el desarrollo de esta Tesis, se encuentran el estudio del efecto de determinadas experiencias de exposición en ratones *Mus musculus* y *Mus spretus* a elementos tóxicos como el Cd, o contaminantes orgánicos como el DDE, administrados conjuntamente con el Se, que permite evaluar el posible efecto antagonista de este elemento respecto a dichos contaminantes. Además, se han realizado experiencias de exposición en ratones *Mus musculus* a cócteles de metales, como As, Cd y Hg, con el fin de evaluar los efectos tóxicos de los mismos de manera conjunta así como el efecto antagónico del selenio. Asimismo, se han evaluado alteraciones en el nivel de determinadas biomoléculas de arsénico tras la exposición del bivalvo *Scrobicularia plana* a este elemento. Por último, se ha estudiado la respuesta biológica de dicho bivalvo al estrés medioambiental en el estuario de Río Guadalquivir.

Entre las metodologías analíticas empleadas, pueden citarse diversos procedimientos metalómicos, proteómicos y metabolómicos, todas ellas orientadas a la búsqueda de biomarcadores de contaminación ambiental en los bioindicadores citados anteriormente. Los métodos analíticos desarrollados en esta Tesis se basan en el empleo de la espectrometría de masas orgánicas e inorgánicas como técnica de detección, debido a su amplio rango de aplicabilidad, sensibilidad y selectividad.

Los estudios metalómicos, se han basado en el acoplamiento de la cromatografía líquida (HPLC) y la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), que permite determinar la alteración de los perfiles de determinadas biomoléculas tras la exposición a contaminantes. Además, para evaluar los cambios en el proteoma de los organismos bioindicadores, tras la exposición a contaminantes, se empleó el acoplamiento nanocromatografía líquida espectrometría de masas en tándem (nanoLC-MS/MS), técnica que se ha convertido en una herramienta esencial en el campo de la proteómica debido a su mayor sensibilidad respecto al

acoplamiento LC-MS/MS convencional, permitiendo el análisis de mezclas de péptidos en pequeñas cantidades de muestras. Finalmente, se han aplicado metodologías metabolómicas en la búsqueda de metabolitos que puedan ser utilizados como biomarcadores de contaminación ambiental. Generalmente, se han empleado técnicas metabolómicas complementarias, incluyendo procedimientos no dirigidos basados en el *screening* de moléculas alteradas mediante infusión directa a un espectrómetro de masas de alta resolución (DI-ESI-Q-TOF-MS) y el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), para la determinación de moléculas de menor masa molecular, que permite tener un perfil más exhaustivo de las alteraciones que sufre el metaboloma como consecuencia de la acción de los contaminantes. El análisis por infusión directa ha mostrado un gran potencial, gracias a su reducido tiempo de análisis y su simplicidad instrumental, aunque la combinación con GC-MS ha permitido identificar nuevos biomarcadores de contaminación ambiental.

Las metodologías analíticas aplicadas en este estudio proporcionan información sobre la respuesta biológica de estos organismos modelo a la contaminación, a través de los cambios de expresión de determinadas biomoléculas como consecuencia de la exposición a los contaminantes. Además, los estudios realizados han permitido profundizar en el conocimiento relacionado con el tráfico de metales, interacciones entre ellos y homeostasis en estos organismos modelo.

SUMMARY

The increasing levels of a growing variety of chemical pollutants in the environment represent a health risk for the exposed organisms as well as for the ecosystems in which they live. Traditionally, the environmental monitoring studies of the ecosystems have been carried out by chemical analysis of conventional pollutants such as toxic trace elements (i.e. Cd, As, Pb, Hg.), organic contaminants (i.e. pesticides, PCBs, PAHs), emerging pollutants (i.e. endocrine disruptors, pharmaceuticals, health care products and detergents) and, more recently, nanoparticles. However, the biological response of an organism against pollutants can not be evaluated with these traditional chemical analyses. For all these reasons, different methodologies have been developed in recent years that allow evaluating the biological response of certain model organisms used as bioindicators against environmental contamination, since they reflect the effect on cellular metabolism and global homeostasis. Among these methodologies we can be highlighted the use of biomarkers, which can be defined as biochemical parameters measured in exposed organisms (bioindicators) that allow identifying, due to their altered levels, the presence of external risk factors, such as the presence of toxic substances. For this purpose free-living organisms are used, which integrate the synergism/antagonism between pollutants and the interaction with other substances present in the ecosystem, alternatively laboratory exposure experiments can be applied, which integrates the effect of one or more selected contaminants.

In this Doctoral Thesis, different -omics methodologies have been applied in the search of biomarkers of environmental stress, both in organisms from estuarine ecosystems, such as the bivalve *Scrobicularia plana*; or terrestrial bioindicators, as the free-living mice *Mus Spretus* and the laboratory mice *Mus Musculus*.

Among the exposure experiments performed under controlled laboratory conditions can be cited those with *Mus musculus* and *Mus spretus* mice with some toxics, such as Cd and DDE, administered together with Se to evaluate its possible antagonistic effect. In addition, exposure experiments to metal cocktails, such as As, Cd and Hg,

have been carried out in *Mus musculus* mice, in order to assess the toxic effects of these metals together and the protective effect of selenium. Alterations in the levels of arsenic biomolecules have also been evaluated after the exposure of inorganic As in the bivalve *Scrobicularia plana*; and finally, free living bivalves were studied in the estuary of Guadalquivir river to evaluate the environmental stress in this area.

Metallomic, proteomic and metabolomic approaches are the analytical techniques used in these studies to look for biomarkers of environmental pollution using the above mentioned bioindicators. All analytical methods developed in this Thesis are based on the use of mass spectrometry as a detection technique, due to its wide range of applicability, sensitivity and specificity.

The metallomic studies have been carried out using liquid chromatography (HPLC) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) to determine altered profiles of some biomolecules after exposure to pollutants. On the other hand, nano liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (nanoLC-MS / MS), has become an essential tool in proteomics due to its greater sensitivity with respect to conventional LC-MS/MS as it allows the analysis of mixtures of peptides in small amounts of samples. For this reason, it was used to evaluate changes in the proteome of bioindicators after exposure to several contaminants. Finally, in order to get a comprehensive analysis of biomarkers of environmental pollution, metabolomic analysis was carried out. To this end, complementary metabolomic techniques were used, including screening procedures based on direct infusion mass spectrometry (DI-ESI-MS) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), for the determination of low molecular mass metabolites. Direct infusion analysis showed a great potential for metabolomic studies, due to its reduced analysis time and its instrumental simplicity, but the combination with GC-MS allowed the identification of new biomarkers of environmental pollution.

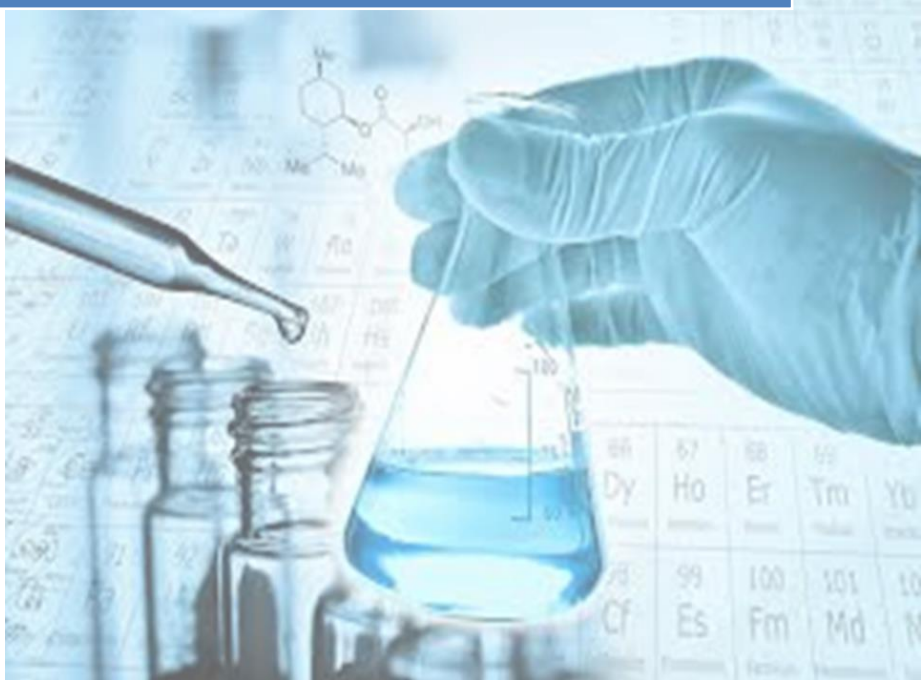
The analytical methodologies applied in this PhD Thesis allow us to deep insight into the biological response of these model organisms against contamination, that is, to

RESUMEN

understand the changes in the expression of certain biomolecules as a consequence of the exposure to certain pollutants. In addition, the studies conducted clarify several biological processes such as metals traffic, interactions between them and homeostasis, which take place in these organisms.

2. INTRODUCCIÓN

Introduction



2. INTRODUCCIÓN

2.1. Los elementos en el medio ambiente

2.1.1. Toxicidad y esencialidad de los elementos químicos

Los metales están presentes en el medio ambiente de forma natural en cada uno de los compartimentos medioambientales: litosfera (corteza terrestre), hidrosfera, atmósfera y biosfera. Algunos metales pesados (ej. cobre, cinc, etc.) son esenciales para mantener el metabolismo del cuerpo humano. Sin embargo, otros elementos son tóxicos y tienen deletéreo sobre los seres vivos. La acción tóxica de los metales pesados puede proceder de la contaminación del agua potable (ej. tuberías del plomo), por su presencia en altas concentraciones en el aire, especialmente en las proximidades de fuentes de emisión, o a través de la cadena alimenticia. La elevada toxicidad de algunos metales pesados procede de su elevada persistencia en el medio natural, los metales pesados son esencialmente no biodegradables, su notable acumulación en los organismos vivos, la formación de moléculas químicas más complejas y en su capacidad de reacción y/o variedad de función (Purves 1977; Förstner y Wittmann 1981; Moalla et al. 1997). Sus efectos tóxicos no se detectan fácilmente a corto plazo, sin embargo a largo plazo pueden llegar a ser irreversibles.

Existen elementos que, aun estando presentes en los tejidos en concentraciones muy pequeñas, a nivel de trazas (mg/L) y ultratrazas (µg/L), son nutrientes esenciales, ya que realizan funciones indispensables para el mantenimiento de la vida, el crecimiento de los seres vivos y su reproducción. Se consideran elementos esenciales el Na, K, Mg, Ca, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, F, P, Cl, I, que se encuentran en el hombre en concentraciones muy bajas, los oligoelementos. Estos elementos desempeñan al menos cinco funciones básicas en los organismos vivos: (i) son parte integral de los centros catalíticos en los que se producen las reacciones necesarias para la vida, (ii) participan en la atracción de moléculas de sustrato y su

conversión en productos finales específicos, (iii) ceden o aceptan electrones en reacciones de oxidación o reducción, (iv) tienen funciones estructurales, proporcionan estabilidad y una estructura tridimensional a ciertas moléculas biológicas importantes, otros ejercen funciones de regulación, (v) controlan procesos biológicos importantes a través determinados mecanismos como la activación hormonal, la unión de moléculas con sus sitios receptores en las membranas celulares y la inducción de la expresión de algunos genes (Maret y Copsey 2012). Por esta razón, es necesario establecer la cantidad mínima de los diversos oligoelementos para que los organismos vivos funcionen adecuadamente. Sin embargo, todos los elementos pueden originar procesos de intoxicación si la dosis ingerida es lo suficientemente elevada. Así, podemos decir, que para los elementos esenciales existe un umbral de concentración mínimo que genera una actividad metabólica insuficiente, una concentración mayor asociada con un funcionamiento bioquímico óptimo y, por encima de esta, concentraciones que tienen carácter tóxico e incluso, letales. Por tanto, existe un rango de concentración, una *ventana biológica*, para cada oligoelemento donde su respuesta fisiológica es óptima, pero fuera del cual se observan efectos carenciales o tóxicos (Figura 1) (Maret y Copsey 2012).

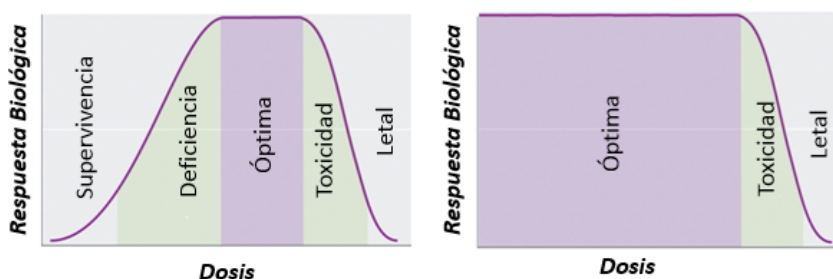


Figura 1. Concentración y respuesta de elementos. Relación entre la concentración y respuesta para elementos esenciales (derecha) y tóxicos (izquierda).

Junto a los elementos traza esenciales en los organismos vivos, existen otros a nivel traza y ultratrazas sin una función fisiológica conocida hasta la fecha, pero que pueden alterar seriamente su metabolismo, originando estados de intoxicación aguda o crónica a concentraciones muy bajas ($\mu\text{g/L}$). Estos elementos se consideran como

tóxicos, entre los que se encuentran, especialmente en el medio ambiente, metaloides como el As y metales pesados como Cd, Cu, Cr, Hg, Ni y Pb. Es importante tener en cuenta que determinados elementos presentan un doble carácter tóxico/esencial, que no solo depende de su concentración sino de la forma o especie química en la que se encuentran, así el Cr^{3+} es esencial pero el Cr^{6+} es cancerígeno, la arsenobetaina es inocua y se excreta directamente en la orina, pero el arsénico inorgánico es tóxico. Todo ello hace necesario la aplicación de procedimientos de especiación química que complementen la información obtenida con las concentraciones totales, como se describe en el apartado 2.2.2. de esta memoria.

Los elementos tóxicos citados, forman parte de los ciclos biogeoquímicos que determinan su presencia y concentración en los distintos componentes de los ecosistemas (agua, aire, suelo y biota) (Figura 2). La perturbación del ciclo biogeoquímico natural de los metales por la acción del hombre viene produciéndose ya desde la Edad de Bronce, aunque la extracción de metales se ha incrementado enormemente desde la Revolución Industrial. Las fuentes antropogénicas más importantes son las actividades relacionadas con la minería, fundición y refinado de metales o aquellas que implican el vertido de aguas residuales procedentes de industrias siderúrgicas, de actividades domésticas o las relacionadas con la agricultura. Durante todos esos procesos se liberan metales al medio ambiente, además de los procedentes de la combustión de combustibles fósiles y carbón. Estos metales se dispersan por todos los compartimentos de los ecosistemas, poniendo a éstos en peligro, así como a todos los organismos que los habitan.

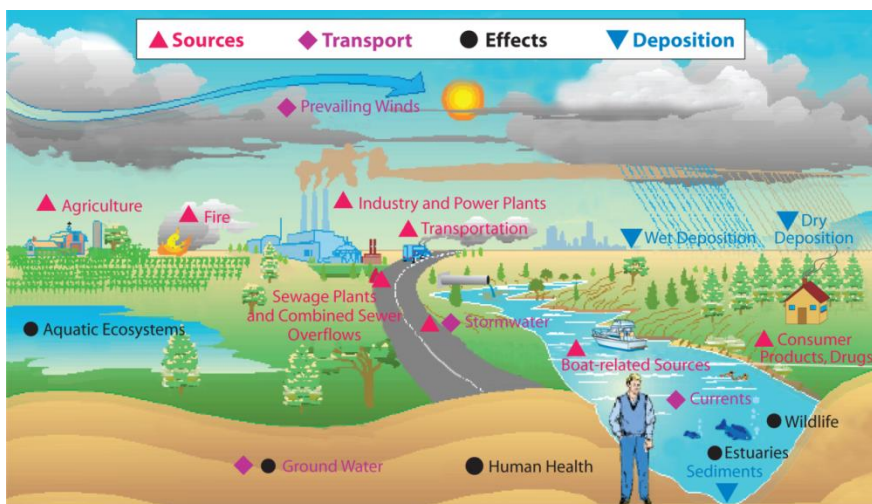


Figura 2. Ciclos biogeoquímicos de los metales pesados.

2.1.2. La problemática de la contaminación ambiental y su diagnóstico

La contaminación es uno de los problemas ambientales más importantes que afectan a nuestro planeta y surge cuando se produce un desequilibrio, como resultado de la introducción de cualquier sustancia en la naturaleza, en dosis que sobrepasen los niveles aceptables para el medio ambiente, causando efectos adversos en el hombre, los animales, vegetales o materiales. Por tanto, se denomina *contaminación ambiental* a la presencia de componentes nocivos (ya sean químicos, físicos o biológicos) en el medio ambiente (natural o artificial) y que puedan suponer un perjuicio para los seres vivos que lo habitan, incluyendo a los seres humanos. En el mundo mueren 9 millones de personas cada año debido a enfermedades relacionadas con la contaminación y la mayoría de ellas (92%) se producen en países de bajos y medios ingresos, donde la contaminación afecta de forma desproporcionada.

Dentro de la contaminación ambiental se pueden distinguir dos tipos fundamentales de fuentes de emisión, en función de su origen (Walker et al. 1997): *contaminación de origen natural*, que se generan en la naturaleza sin intervención de la mano humana; y *contaminación de origen antropogénico*, que se produce como consecuencia de las

acciones y actividades del ser humano. Entre las principales actividades antropogénicas que alteran el “estatus natural” del medio ambiente, pueden citarse las de transformación (química, metalúrgica, petrolífera, etc.), las de extracción de minerales, y las agroquímicas. Además, hay que tener en cuenta las grandes catástrofes medioambientales, como consecuencia de los vertidos accidentales al mar o los ríos y los desastres ecológicos. Todas estas actividades alteran el equilibrio natural de un ecosistema, ya que liberan sustancias tóxicas minerales (metales pesados y sus compuestos, materiales radiactivos, etc.) u orgánicas (plaguicidas y fertilizantes, dioxinas, hidrocarburos, etc.), en cantidades que causan efectos adversos en el hombre, los animales y/o vegetales. Por tanto, la acción antropogénica afecta a la supervivencia de los organismos, perturba la estructura y función de los ecosistemas naturales, modificando el número de especies (por introducción de especies exóticas o eliminación de las nativas), alterando la diversidad de los ecosistemas y hábitats naturales (Steinberg et al. 1994; Calamari 2002; Marchini 2002; Bernal et al. 2007). La figura 3 muestra los principales tipos de contaminación y sus fuentes.



Figura 3. Principales tipos de contaminación y sus fuentes.

Los compuestos liberados en el medio ambiente, ya sea en ecosistemas acuáticos o terrestres, rara vez permanecen en el sitio donde fueron emitidos (Hodgson 2004; Montforts 2006). Por ello es importante conocer su persistencia, como en el caso de los metales por su carácter no biodegradable, así como su capacidad para evolucionar o transformarse en el medio, pudiendo generarse especies más tóxicas que las originales. Por ello es importante saber tanto el estado físico como la forma química en se encuentran las diferentes especies metálicas para poder estimar su biodisponibilidad (Usero y Gracia 1997; Bebianno y Serafim 1998; Martín-Díaz et al. 2008).

Una vez incorporados al organismo los contaminantes pueden sufrir distintos procesos:

- *Bioacumulación*, que se produce cuando un organismo incorpora un contaminante y lo retiene en los diversos órganos durante mucho tiempo.
- *Biomagnificación*, proceso que se produce en la cadena trófica, por acumulación progresiva del contaminante en las distintas etapas de dicha cadena, lo que origina un enriquecimiento progresivo del contaminante a medida que se va subiendo a un nivel superior, incrementándose de manera progresiva el efecto tóxico de la contaminación.

En este sentido, los metales pesados tiene consecuencias impredecibles, al ser ellos en sí mismo “intransformables”, de ahí que la problemática que presentan los metales en el medio ambiente tenga un carácter singular. Los metales se incorporan a los organismos de vida libre pasando a sus depredadores, a través de una cadena bioquímica compleja en la que las metalo-biomoléculas van sufriendo cambios progresivos asociados a mecanismos de acumulación-defensa-protección-eliminación. La toxicidad de estos metales pesados es proporcional a la facilidad de ser absorbidos por los seres vivos; el metal en forma iónica se absorbe con más facilidad que en forma elemental. A nivel celular los metales pesados generan

especies reactivas del oxígeno que promueven estrés oxidativo y daño de biomoléculas, alterando el estado de algunas proteínas e induciendo enzimas antioxidantes (Sies 1986; Lopez-Barea 1995).

En función de lo comentado previamente se desprende la necesidad de realizar seguimientos periódicos de los diferentes contaminantes presentes en los ecosistemas, con objeto de evaluar su calidad medioambiental. El monitoreo de contaminantes en el medio ambiente proporciona información de los efectos tóxicos, si existen, y ayuda a conocer las áreas de impacto y trazar líneas rojas en las zonas donde la presencia de estos contaminantes alcanzan niveles indeseables. Además, es conveniente conocer la tendencia de estos contaminantes a lo largo del tiempo, ya que los datos recogidos nos permiten relacionar una sustancia tóxica particular con los posibles problemas medioambientales que origina (Galloway et al. 2002).

Generalmente, la forma de monitorizar la presencia de estos contaminantes en los sistemas ambientales es mediante el uso de procedimientos de análisis convencionales que permiten diagnosticar su presencia en aguas, sedimentos, suelos y aire. No obstante, el análisis de las concentraciones totales de metales o contaminantes orgánicos en estos medios, solo proporciona información de la mayor o menor presencia de los mismos en cada tipo de muestra, pero no informa sobre su disponibilidad y efectos biológicos en los organismos que habitan el medio en estudio. Alternativamente, una forma más eficiente de evaluar las consecuencias de la contaminación en los ecosistemas combina la evaluación química de la presencia de los contaminantes con la evaluación de la respuesta biológica (biomarcadores) de determinadas especies características de la zona de estudio (bioindicadores) (Bonilla-Valverde et al. 2004; González-Fernández et al. 2008a; García-Barrera et al. 2012; García-Sevillano et al. 2012). Esta evaluación de la contaminación a través de la respuesta de los organismos vivos del hábitat en estudio, se aproxima mucho más a las consecuencias que pueden tener los episodios contaminantes, que el mero análisis químico de la presencia de dichos contaminantes (López-Barea y Pueyo 1998).

Los mecanismos de la ingesta de metales difieren de los animales a las plantas, pero cuando se incorporan a los diversos organismos, las metalobiomoléculas que se generan son transportadas a los diferentes órganos y compartimentos celulares donde se transforman en metaloproteínas o metalometabolitos bioactivos (Figura 4) (Gómez-Ariza et al. 2011). En general, estos procesos involucran un conjunto de interacciones de metales y cambios de metabolitos que es necesario descifrar para evaluar la respuesta biológica a la contaminación ambiental (González-Fernández et al. 2008a; García-Barrera et al. 2012; García-Sevillano et al. 2012).

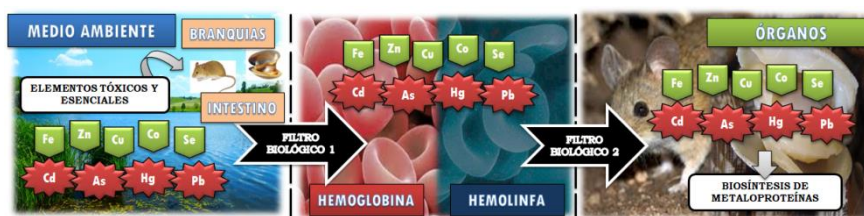


Figura 4. Ciclos homeostáticos y cambios metabólicos de los elementos causados por contaminantes.

Este hecho ha provocado que en los últimos años se hayan propuesto numerosos estudios con el uso biomarcadores que evalúan la incidencia de los contaminantes en una gran variedad de organismos modelo (bioindicadores), tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos (Bonilla-Valverde et al. 2004; Romero-Ruiz et al. 2006; Vioque-Fernández et al. 2007). No obstante, el uso de estos biomarcadores convencionales exige un profundo conocimiento de sus mecanismos de toxicidad y solo permiten abordar procesos conocidos, generalmente muy bien establecidos, desde una perspectiva estática, pero ignoran otros muchos cambios que puedan experimentar los seres vivos, desde una perspectiva dinámica mucho más próxima a la realidad, como las modificaciones en la expresión de las proteínas o los metabolitos. En este sentido, el uso de técnicas de análisis masivo (las ómicas) constituyen una alternativa prometedora para la diagnosis de problemas medioambientales (Gómez-Ariza et al. 2008; González-Fernández et al. 2008b).

2.1.3. Interacciones biológicas entre elementos: el papel del selenio como antagonista

Actualmente, existe una gran cantidad de estudios sobre la respuesta biológica e implicaciones toxicológicas de los elementos, así como los métodos analíticos de especiación química para llevar a cabo su análisis. Sin embargo, las metalobiomoléculas se encuentran en los sistemas biológicos en un ambiente complejo donde las diferentes especies químicas pueden interactuar entre ellas de forma antagónica o sinérgica, por lo que el metabolismo de los elementos traza esenciales o tóxicos no puede considerarse de forma aislada (Hill y Matrone 1970; García-Barrera et al. 2012). Ello lleva al concepto de *interacción biológica* como modificación del efecto de un elemento por la acción de otro cuando se administran conjuntamente.

Cuando la interacción da lugar al aumento de efecto de uno o de los dos elementos se habla de *efecto sinérgico*. Una *sinergia* tiene lugar cuando el efecto final es aproximadamente igual o mayor a la suma de los efectos de ambos elementos por separado. El concepto contrario a la sinergia es el *antagonismo*. Dos elementos son antagonistas cuando la interacción da lugar a una disminución de los efectos de uno o ambos elementos.

En este sentido, el Se es un oligoelemento esencial para el cuerpo humano con un importante papel antioxidante, eliminador de radicales libres y protector del daño oxidativo en los tejidos y órganos. También es un potenciador del sistema inmunológico del cuerpo humano.

En la bibliografía, las interacciones más estudiadas están relacionadas con los elementos tóxicos arsénico, cadmio, y mercurio. La mayoría de estos estudios investigan el carácter antagónico del selenio con respecto a estos elementos. Sin embargo, existen otros estudios en los que se han puesto de manifiesto importantes interacciones entre otros elementos (García-Barrera et al. 2012). Así el selenio puede

también interactuar con níquel, como se ha comprobado en experiencias llevadas a cabo con ratas Wistar, que muestran que los efectos de NiCl_2 en la reproducción de ratas son antagonizados por Na_2SeO_3 (Se/Ni) (Käkelä et al. 1999). También se han descrito interacciones entre Cd, Cu y Pb en relación con las actividades de ureasa y deshidrogenasa del suelo (Chaperon y Sauvé 2008). Asimismo, se han observado importantes interacciones antagonistas entre Cu y Zn (Bremner y Beattie 2005) y de Zn respecto a la inducción anormal de lípidos en sangre de ratas tratadas con arsénico (Zn/As) (Fang et al. 2006). Finalmente, se ha descrito la interacción entre cobre y molibdeno en la diabetes mellitus (Mo/Cu) (Garay Sevilla et al. 2011).

Por otro lado, existen numerosos estudios sobre la sustitución de elementos, como la de azufre por selenio (Se/S). De hecho, el wolframio reemplaza al molibdeno (W/Mo) y el cadmio reemplaza al zinc (Cd/Zn) en algunas familias de enzimas (Lane TW y Morel FM 2000; Hille 2002), mientras que el cobre sustituye al hierro (Cu/Fe) como portador de oxígeno en algunos artrópodos y moluscos (Jameson y Ibers 2007). Sin duda la interacción más sorprendente hasta el momento, es el crecimiento de la bacteria *GFAJ-1* que puede crecer en un medio que contiene arsénico en lugar de fósforo, sugiriendo que el arsénico puede estar presente en macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos (As/P) (Barge et al. 2011).

En conclusión, el Se tiene un potencial citoprotector contra la toxicidad de algunos metales tóxicos siguiendo varios mecanismos, como el aumento de enzimas antioxidantes, reducción de la peroxidación lipídica, protección de los daños mitocondriales, modulación de las señales de transducción de la apoptosis, etc. La figura 5 muestra los posibles mecanismos propuestos del efecto protector del Se frente a la toxicidad de ciertos metales.

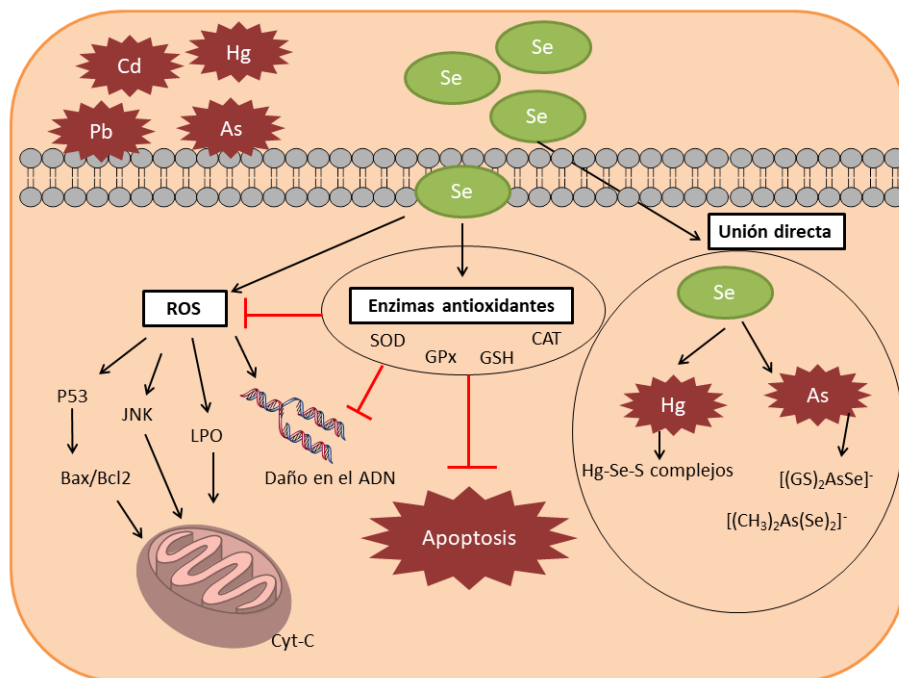


Figura 5. Representación gráfica de los mecanismos de protección del selenio frente a la toxicidad de elementos no esenciales.

Interacción arsénico/selenio (As/Se)

Se y As son dos metaloides con características peculiares ya que en relación al primero se han descrito propiedades anticancerígenas y el segundo es un conocido agente carcinogénico. Sus mecanismos de interacción han sido investigados por numerosos grupos, habiéndose descrito la primera evidencia científica del antagonismo arsénico-selenio en 1938, mediante un experimento con ratas, en las que se comprobó que determinadas dosis de arsenito inhibían el daño hepático letal causado por el selenito (Moxon 1938).

Sun y colaboradores (Sun et al. 2014) han propuesto dos tipos de interacciones entre Se y As, la primera basada en que una exposición a baja concentración de Se podría ser antagónica frente a la toxicidad del As, por la excreción del compuesto As-Se $[(GS)_2AsSe]^-$ y la segunda, basada en la administración de altas dosis de Se, que

produce un efecto sinérgico a la toxicidad causada por As a través de la reacción con S-adenosilmetionina y glutatión y la modificación de la arsenito metiltransferasa (Sun et al. 2014).

Recientemente, se han demostrado numerosos efectos beneficiosos del Se frente a la toxicidad provocada por varios arsenicales. En este sentido, se sabe que la exposición a arsénico se asocia con una mayor producción de radicales libres y un aumento del estrés oxidativo, que puede ser reducido por la acción de selenoproteínas (Shi et al. 2004). Además, algunos autores han llegado a la conclusión de que una ingesta de selenio en la dieta puede reducir el riesgo de lesiones cutáneas relacionadas con el arsénico (Yang et al. 2002; Chen et al. 2007), pero la ingesta diaria recomendada de selenio puede no ser adecuada en presencia de factores fisiológicos extremos, como la exposición crónica al arsénico en el agua potable (Chen et al. 2007).

En experimentos llevados a cabo con células PC12, se investigó el papel citoprotector del Se (10 μ M) contra los efectos tóxicos del As (10 μ M), mediante una exposición simultánea a ambos elementos durante 48h (Tan et al. 2017). Este trabajo demuestra que la combinación de As y Se provoca una significativa disminución del daño en el ADN, una mejor protección antioxidante e inhibición de la apoptosis celular en comparación con las células tratadas solamente con As (Tan et al. 2017). Además, investigaciones previas han demostrado que Se y As comparten una vía de metilación bastante similar (Kenyon et al. 1997; Sun et al. 2014). En este sentido, se ha propuesto como hipótesis la formación de un compuesto As-Se que posiblemente podría tener menos toxicidad que la exposición de manera individual a ambos elementos. Jourgen Gailer (Prince et al. 2002) fue pionero en proponer la hipótesis de un nuevo compuesto de As-Se denominado ion selenobis (S-glutationil) arsinio $[(GS)_2AsSe]^-$, que puede ser excretado fácilmente de los hepatocitos a la bilis. Otro estudio, describió la formación de un compuesto similar de As-Se que se forma en los eritrocitos pasando al torrente sanguíneo (Prince et al. 2002). Además, se ha

observado la formación de otro compuesto As-Se $[(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{Se})_2]^-$ (Prince et al. 2002; Gailer et al. 2003).

Por otro lado, Sah y colaboradores estudiaron el papel de la ingesta de Se en la desintoxicación de As (Sah et al. 2013). Estos autores concluyeron que una dieta enriquecida con Se en ratas (0.3 mg/kg) provoca una mayor excreción fecal y urinaria de As en las ratas tratadas, mejorando simultáneamente el nivel de GSH y otros indicadores de salud (Sah et al. 2013). En este sentido, Rossman y Uddin (Rossman y Uddin 2004) demostraron que el Se puede proteger contra el daño oxidativo del ADN mediante la regulación de selenoproteínas, como GPx y tioredoxina reductasa (Rossman y Uddin 2004). También se ha demostrado que la presencia de SeMet con As(III) promueve la aparición de proteínas fosforiladas (Alp et al. 2011). Además, otros estudios han demostrado que un alto contenido de Se (0.3 mg/kg) puede revertir la arterosclerosis provocada por la ingesta de As en ratones (Krohn et al. 2016).

Interacción cadmio/selenio (Cd/Se)

El Cd está clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como carcinógeno del Grupo I para humanos. De acuerdo con la OMS (World Health Organization (WHO) 2010), la ingesta mensual tolerable de Cd es 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, mientras que la concentración en agua potable y aire son, 3 $\mu\text{g}/\text{L}$ y 5 ng/m^3 , respectivamente. Los límites biológicos humanos para compuestos de Cd se encuentran entre 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ y 0,8 $\mu\text{g}/\text{L}$ en orina (Hartwig et al. 2010).

El cadmio se acumula principalmente en el hígado y el riñón y ambos órganos son críticos para la toxicidad aguda del cadmio (Goyer et al. 2001; Nordberg 2009; Jihen et al. 2010). Varios estudios han revelado que la exposición a cadmio implica el agotamiento de glutatión reducido (GSH), la inhibición de las enzimas antioxidantes, inhibición del metabolismo de la energía y estrés oxidativo, además de aumentar la peroxidación lipídica y la oxidación del ADN (Zhai et al. 2013). Estudios previos llevados a cabo en animales han revelado los efectos protectores de Se contra el

estrés oxidativo inducido por Cd en diversos órganos como testículo, hígado y riñón. En estos estudios (Newairy et al. 2007), las ratas expuestas a cloruro de cadmio (CdCl_2) exhibieron una disminución del contenido de GSH y una disminución de la actividad de las selenoenzimas antioxidantes en el hígado. Sin embargo, todos estos efectos negativos se inhibieron notablemente en los animales tratados con selenito de sodio (Na_2SeO_3) durante la exposición con CdCl_2 (Newairy et al. 2007). Un experimento similar, llevado a cabo con aves expuestas simultáneamente durante 100 días a Se (10 mg/kg) y Cd (150 mg/kg) a través de la dieta mostró cambios significativos en los análisis histopatológicos de los testículos. La exposición a Cd aumentó significativamente el estrés oxidativo y redujo el nivel de enzimas antioxidantes (SOD y GPx) (Li et al. 2010). Sin embargo, la co-exposición de Se y Cd revirtió significativamente los cambios inducidos por la exposición al segundo y también redujo la apoptosis en las células de los testículos (Li et al. 2010). Además, otro estudio mostró que tras la exposición a Cd en ratas, el nivel de Se en testículos se reduce significativamente en comparación con el grupo control (Saïd et al. 2010). Sin embargo, después de la administración simultánea de Se y Cd, el nivel de Se aumentó significativamente en comparación con el grupo tratado con Cd y posteriormente el nivel de Cd se reduce también en comparación con el grupo control (Saïd et al. 2010).

Recientemente, se han llevado a cabo estudios con líneas celulares humanas. Por ejemplo, se ha descrito que el Se protege frente a la apoptosis inducida por Cd en células del riñón (LLC-PK1) a través de la regulación de ROS y la fosforilación de la quinasa c-jun N-terminal (c-JNK) estabilizando la interrupción de la membrana mitocondrial (Liu et al. 2007; Zhou et al. 2009). Recientemente, otros autores han demostrado que el Se (5 μM) aumenta la expresión de glutatión peroxidasa (GPx1) en coexposición con Cd (5 μM) en células PC12. Por lo tanto, el Se protege a las células PC12 de la apoptosis inducida por el Cd reduciendo la liberación al citosol de citocromo c y promoviendo la expresión de ERK1 después de 48 h de incubación (Rahman et al. 2018). Sin embargo, estos autores también encontraron que una

concentración ligeramente más alta de Se era tóxica para las células PC12 mediante la inducción de la muerte celular autofágica (Rahman et al. 2018).

En este sentido, el Se tiene un potencial citoprotector contra la toxicidad por Cd siguiendo varios mecanismos de defensa, tales como la formación Cd-Se insolubles, aumento de enzimas antioxidantes (El-Maraghy et al. 2001), reducción de la concentración de radicales libres (Nehru y Bansal 1997), etc.

Interacción mercurio/selenio (Hg/Se)

El Hg está presente en la naturaleza de diversas formas: elemental (o metálico), inorgánico (ej: cloruro de mercurio) y orgánico (ej: metil/etilmercurio). Todas estas formas tienen diferentes toxicidades e implicaciones para la salud. Las vías de exposición son la ingestión, inhalación y contacto dérmico. El efecto protector que el Se ejerce frente a la toxicidad del Hg se conoce desde hace más de cuatro décadas y fue descrito por primera vez por Parizek y Ostadalova en 1967 (Parizek y Ostadalova 1967). Estos investigadores demostraron la desaparición del efecto tóxico del mercurio cuando ambos compuestos, cloruro de mercurio y selenito se administraban simultáneamente a ratas. Los riñones de estas ratas no mostraron variaciones a nivel macroscópico o daño histológico, como necrosis en los túbulos renales, a diferencia de lo que ocurría cuando solo se les administraba Hg. Después de este, son muchos los estudios que han tratado este hecho, promoviendo un gran número de investigaciones sobre la posible interacción Hg/Se particularmente en relación con su neurotoxicidad, fetotoxicidad (Raymond y Ralston 2004; Choi et al. 2008; Glaser et al. 2010; Farina et al. 2011) y enfermedades cardiovasculares (Yoshizawa et al. 2002). Sin embargo, otros estudios han revelado que el selenio inorgánico es ineficiente contra los daños cerebrales causados por el MetHg, y que también produce toxicidad (Glaser et al. 2010). Recientemente, Li y colaboradores han llevado a cabo un estudio centrado en los residentes de zonas mineras con intoxicación por Hg inorgánico, comprobándose que la suplementación con una dosis moderada de Se orgánico puede aumentar la excreción Hg en los residentes locales (Li et al. 2011).

Las interacciones entre Hg y Se dependerán en gran medida, de las formas químicas en que ambos elementos se administren. Se ha realizado un gran número de estudios que relacionan el efecto protector de los selenocompuestos frente a la toxicidad del Hg. Los estudios desarrollados por Fang para reducir los niveles renales de Hg, mostraron que si se comparan equimolarmente, el orden de efectividad es el siguiente: SeMet > SeCys > selenato > selenito (Fang 1977).

A pesar de la gran variedad de estudios existentes y de la información disponible, los mecanismos exactos de interacción entre Hg y Se no se han dilucidado completamente hasta la fecha. En este sentido, se han propuesto diversos mecanismos para explicar las interacciones que se producen: (i) redistribución del Hg desde órganos más sensibles a otros menos sensibles (Sørmo et al. 2011); (ii) competencias por los mismos puntos de unión (Leonzio et al. 1982); (iii) formación de complejos insolubles Hg-Se (Ikemoto et al. 2004); (iv) prevención del daño oxidativo causado por el Hg mediante su transformación en otras formas menos tóxicas (Farina et al. 2011).

Interacción DDE y Se

Entre los contaminantes orgánicos más de mayor incidencia, uno de los más persistentes es el 1,1,1-tricloro-2,2-bis (p-clorofenil) etano (DDT) y su producto de degradación 1,1-dicloro-2,2-bis (p -clorofenil) etileno (DDE), clasificado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) como carcinogénico para los seres humanos. Los datos toxicológicos sobre DDE, sugieren que el hígado es el principal órgano diana en mamíferos (2002). El DDE es un disruptor endocrino y antiandrogénico (Longnecker et al. 2007), así como un neurotóxico conocido, implicado en la enfermedad de Parkinson y Alzheimer (Compta et al. 2011), probablemente a través del estrés oxidativo (Dowling et al. 2006). El DDE en sí no tiene usos comerciales y solo se encuentra en el medio ambiente como resultado de la contaminación y/o la degradación del DDT. Algunos autores, han demostrado la capacidad del Se para modificar el estado y la función redox de algunas proteínas así como su papel en el

mantenimiento de la homeostasis celular en el hígado de ratones expuestos a p,p'-DDE (Morales-Prieto et al. 2018).

Existen pocos estudios sobre la interacción biológica del selenio con contaminantes orgánicos. En este sentido, se ha demostrado la acción protectora del selenio frente al estrés oxidativo y la peroxidación lipídica causada por el fenitrotión (pesticida organofosfato) en ratas (Milošević et al. 2017), así como los beneficios de la suplementación de selenio y vitamina C en los niveles de hemoglobina de los agricultores que trabajan con fumigadores (Suwondo et al. 2017).

2.1.4. Monitorización de la contaminación. Bioindicadores.

La importancia de monitorizar los efectos de los metales tóxicos en organismos vivos ha aumentado progresivamente, con el fin de evaluar las consecuencias de los cambios naturales y las actividades antropogénicas, que han provocado un aumento de los niveles de estos contaminantes en ecosistemas terrestres y acuáticos. En este sentido, el impacto de la contaminación sobre la respuesta biológica de una especie, *bioindicador* (un organismo de vida libre que proporciona información sobre la calidad del medio ambiente que le rodea), se ha utilizado para medir el efecto real de los xenobióticos en dicho medio ambiente, especialmente la contaminación por metales (Livingstone et al. 1989; Peakall 1994; Lopez-Barea 1995). Para este propósito, algunos organismos modelos, tales como cangrejos de río (Gago-Tinoco et al. 2014), peces (Kokushi et al. 2010), moluscos (Jones et al. 2008), roedores (García-Sevillano et al. 2014b), lombrices (Bundy et al. 2008b), bacterias (Zhang et al. 2012) y plantas (Brouquisse et al. 2010) se han utilizado como especies bioindicadoras en estudios de biomonitorización, utilizando la respuesta biológica, basada en perturbaciones metabólicas, para evaluar los problemas de contaminación. Estos estudios consideran que la evaluación de los cambios inducidos por los metales en las vías metabólicas celulares es crucial para entender las respuestas biológicas de los organismos vivos bajo la exposición ambiental.

Para una correcta evaluación de la respuesta de los sistemas vivos a la contaminación conviene utilizar bioindicadores medioambientales de complejidad biológica creciente (p.ej. crustáceos, moluscos, roedores), debiendo incluirse siempre un mamífero que integre los diversos filtros biológicos (Maret 2010) que están presentes en el hombre y que regulan el tráfico de contaminantes y su interacción con biomoléculas vitales (Gómez-Ariza et al. 2011) (p. ej. Absorción en el tracto digestivo ↔ transporte por el torrente sanguíneo ↔ paso de las paredes celulares en los órganos ↔ incorporación y transporte en el citosol de células y orgánulos ↔ síntesis de metaloproteínas).

Un experimento de biomonitorización satisfactorio debe comenzar definiendo los contaminantes implicados, seleccionando los sitios de muestreo (problema y referencia o control) y una cuidadosa selección del organismo de estudio o bioindicador, que debe reflejar adecuadamente el ecosistema considerado. Posteriormente, se debe proceder a la elección del tipo de célula, tejido o fluido biológico, lo cual es también importante, ya que la respuesta de los organismos vivos a la contaminación puede ser detectada en diferentes matrices biológicas. En estudios de monitorización ambiental, los organismos de vida libre están sujetos a una elevada variabilidad metabólica interindividual como resultado de su interacción con el medio ambiente. Este hecho es difícil de reproducir en los laboratorios, por lo que en estudios de monitorización medioambiental es recomendable el muestreo de organismos de vida libre (Viant 2008). Por otra parte, en experimentos de exposición controlada la concentración y biodisponibilidad del metal, condiciones de exposición y duración de experimento controlado son parámetros importantes a tener en cuenta, que deben ser seleccionados sobre la base del experimento diseñado. En estos estudios, aunque no es un escenario real, las alteraciones metabólicas se pueden extrapolar a problemas ambientales complejos.

Una buena especie bioindicadora debe cumplir las siguientes características (Lower y Kendall 2018):

- Tolerancias ambientales estrechas,
- Presentar una gran abundancia, al tiempo que se registra la ausencia de otras especies que bajo condiciones normales estarían presentes,
- Presentar una estrecha relación entre la concentración del contaminante en sus tejidos y la concentración del contaminante en el ambiente,
- Ser sedentaria,
- Tener una distribución amplia para facilitar comparaciones,
- Tener una permanencia larga que permita registrar el efecto del contaminante a largo plazo,
- Tener una variabilidad genética y ecológica baja,
- Tener características biológicas y ecológicas conocidas,
- Ser adaptables a estudios de laboratorio.

De entre todos los bioindicadores disponibles, en esta Tesis se han seleccionado tanto organismos terrestres, el ratón de vida libre *Mus Spretus* y el ratón de laboratorio *Mus musculus*; como organismos acuáticos, como el bivalvo *Scrobicularia plana*.

Bioindicadores de contaminación ambiental en sistemas terrestres

La mayoría de los estudios de monitorización ambiental en mamíferos terrestres se han realizado en roedores. En contraste, solo se han llevado a cabo algunos estudios de contaminación ambiental con humanos como bioindicadores de la contaminación de metales (Dudka et al. 2014; Gao et al. 2014).

Mediante estudios previos de monitorización se ha demostrado la capacidad que tienen los pequeños mamíferos, concretamente los ratones de vida libre, para acumular una amplia gama de contaminantes que están presentes en los ecosistemas (Talmage y Walton 1991). De esta manera, se ha encontrado una relación directa entre la exposición a metales pesados (Cristaldi et al. 1991),

pesticidas (McBee y Bickham 2005) y radiactividad (Cristaldi et al. 1990) con el daño genético que pueden sufrir estos roedores.

Algunos estudios han demostrado los beneficios del uso del ratón de vida libre *Mus spretus* como un organismo modelo muy útil para la evaluación de la calidad medioambiental de los ecosistemas en el que habita, ya que este bioindicador tiene la capacidad de acumular un amplio espectro de agentes contaminantes presentes en el ecosistema (Ruíz-Laguna et al. 2001; Bonilla-Valverde et al. 2004; Montes-Nieto et al. 2007). En estos estudios, los ratones morunos se utilizaron como organismos bioindicadores de la contaminación en el entorno de Doñana producida por la rotura de la balsa de la mina de Aznalcóllar y la acción de los lixiviados procedentes de esta mina, con elevadas concentraciones de metales pesados como arsénico; así como el efecto de los pesticidas en determinadas zonas con elevada actividad agrícola.

El ratón silvestre *Mus spretus* es un múrido de pequeño tamaño, con hocico redondeado, ojos y orejas pequeños. Los adultos presentan una coloración dorsal gris castaño, con una franja cefalocaudal más oscura. Poseen vientre blanco grisáceo, con una nítida línea de separación lateral entre ambas regiones corporales. Esta especie puede localizarse en ambientes rurales de la Región Mediterránea Occidental, ocupando la parte mediterránea de la Península Ibérica, costa mediterránea de Francia y Norte de África. Ocupa ambientes típicamente subhúmedos y semiáridos. Este pequeño animal se alimenta de plantas, semillas e insectos y es una especie clave de la cadena alimenticia del Parque Nacional de Doñana, situado al suroeste de España, ya que forma parte del régimen alimentario de numerosas especies de depredadores como las aves rapaces diurnas y nocturnas, mamíferos carnívoros y ofidios (Kufner 1986). De esta manera se transfieren los contaminantes a una multitud de especies, algunas de ellas en peligro de extinción como el lince (*Lynx pardina*) (Tull-Singleton et al. 1994).

Sin embargo, uno de los inconvenientes que presenta el uso de *Mus spretus* son los elevados costes que representa su empleo en ensayos de exposición en el

laboratorio, sobre todo cuando se quiere adquirir en cepas genéticamente puras y sin contaminación. Además esta especie aún no ha sido secuenciada genéticamente, lo que representa un problema a la hora de su estudio. En su lugar, se utiliza como organismo modelo el ratón de laboratorio *Mus musculus*, que ha sido secuenciado y presenta una estrecha homología genética con el ratón de vida libre *Mus spretus* (Ruiz-Laguna et al. 2004). Las variaciones fenotípicas (edad, sexo y condiciones de vida) y genéticas en el ratón de laboratorio son menores comparadas con el ratón de vida libre. El grupo de la Profesora Carmen Pueyo de la Universidad de Córdoba ha demostrado que las secuencias genéticas de ambas especies son muy parecidas. Esto facilita la traslación de los resultados de los estudios –ómicos en los ratones *Mus musculus* a los ratones de vida libre *Mus spretus* con el fin de conocer la acción de los contaminantes en los ecosistemas terrestres (Montes-Nieto et al. 2007). La figura 6 muestra una fotografía del ratón de vida libre *Mus spretus* y el ratón de laboratorio *Mus musculus*.



Figura 6. Ratón de vida libre *Mus spretus* y ratón de laboratorio *Mus musculus*.

Los ratones de laboratorio *Mus musculus* que se utilizan en experiencias de laboratorio suelen ser albinos. El rasgo anatómico más característico para diferenciarlos de otras especies como el ratón de vida libre *Mus spretus*, además de la coloración, es la longitud de la cola, ya que en el caso de *Mus musculus* la longitud de la cola es superior a la longitud de la cabeza más el cuerpo, sin embargo en el ratón moruno (*Mus spretus*) la longitud de la cola no supera a la del cuerpo.

Para un experimento científico se deben escoger ratones que pertenezcan a una misma cepa pura o endogámica. Los individuos de una misma cepa llevan los mismos genes, por lo cual se facilita la comparación de los efectos de los diferentes tratamientos experimentales (fármacos, entorno físico, etc.), sin que se produzca variabilidad debido a las diferencias genéticas. La cepa más utilizada ha sido la BALB/c (ratón albino).

Las características que han hecho del ratón de laboratorio *Mus musculus* el modelo biológico y biomédico más utilizado en las investigaciones científicas son:

- Su fácil manejo,
- Su tamaño apropiado para la crianza y manipulación,
- No requerir demasiados cuidados,
- Son mamíferos eutorios, por tanto poseen un genoma muy similar al de los seres humanos,
- Tienen un alto número de crías,
- Poseen un breve período de gestación (19-21 días) y destete rápido,
- Las hembras producen un gran número de óvulos, los cuales al ser fecundados son muy resistentes,
- Al ser mamíferos euterios, poseen un genoma muy similar al de los seres humanos.

Bioincadores de contaminación ambiental en sistemas acuáticos

Los ambientes acuáticos son los más afectados por la contaminación ambiental debido a la descarga continua de elementos tóxicos, provocado principalmente por las actividades industriales, por derrames accidentales o por la deriva de productos agrícolas. Existen numerosas evidencias que indican que muchos de estos agentes contaminantes al llegar a los sistemas acuáticos, son incorporados por los organismos que allí habitan pudiendo desencadenar procesos de estrés oxidativo.

El uso de organismos invertebrados para monitorizar los efectos de los metales en ecosistemas acuáticos es limitado. Los bivalvos son normalmente los bioindicadores más usados en este ámbito (García-Sevillano et al. 2015b). Los bivalvos pertenecen al filo *Mollusca*, que son los invertebrados más numerosos después de los artrópodos, y se caracterizan por tener el cuerpo aplanado lateralmente y una concha con dos piezas o valvas, que lo cubre completamente.

Estos bioindicadores presentan importantes ventajas para la monitorización de ecosistemas acuáticos, se tratan de organismos sésiles con un largo ciclo de vida, se muestrean con facilidad y su manipulación es sencilla, proporcionando una cantidad de tejido adecuada para el análisis (Elder y Collins 1991). Además, presentan una tolerancia excepcional a los factores ambientales y pueden acumular altas cantidades de contaminantes, como metales.

Las zonas naturales donde se localizan estos bivalvos, los estuarios, son consideradas como entornos biológicos de alto riesgo, por ser áreas ambientalmente sensibles a la contaminación y a la alteración de variables físicas como la temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto. Estos organismos bentónicos habitan en sedimentos de estuarios marinos, en los cuales los niveles de toxicidad están relacionados con una gran variedad de productos químicos procedentes de las actividades industriales, urbanas, agrícolas y marítimas, los cuales provocan que sus efectos se puedan acumular a lo largo de la cadena trófica. Estos hechos hacen que los estuarios sean puntos críticos, a veces muy inadecuados para el desarrollo de la fauna y flora (Pennings y Bertness).

Los cambios metabólicos más importantes asociados a la exposición al metal de los bivalvos están relacionados principalmente con la perturbación del metabolismo energético y la regulación osmótica, o efectos neurotoxicológicos bajo la acción de ciertos metales como: As (Ji et al. 2013; Wu et al. 2013), Cd (Zhang et al. 2011b), Cd/Zn (Wu et al. 2011), Cu (Zhang et al. 2011a) y Hg (Liu et al. 2011), utilizando *R. philippinarum* como bioindicador. En estos estudios, las branquias y glándula

digestiva se utilizan como órganos diana, siendo los primeros órganos afectados por contaminantes, pudiendo acumular grandes cantidades de los mismos.

Asimismo, el bivalvo *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) (Figura 7) ha sido ampliamente usado en estudios de contaminación ambiental para evaluar la bioacumulación de contaminantes en estuarios (Gómez Ariza et al. 2018).



Figura 7. Bivalvo *Scrobicularia plana*

2.1.5. Monitorización de los efectos biológicos. Biomarcadores.

La introducción de compuestos tóxicos en los ecosistemas acuáticos y terrestres, produce una variedad de respuestas en los organismos, condicionadas por diferentes factores como: grado de toxicidad; concentración, tiempo de exposición, características ambientales del sistema receptor, edad y condición de los organismos expuestos, presencia de otros tóxicos, capacidad de biodegradación del compuesto y procesos de transporte, es decir, la distribución del compuesto químico entre la atmósfera, el agua y el suelo, dependiendo de la afinidad de dicho compuesto por cada fase (Hart y Fuller 1974; EPA 1982).

En las últimas décadas, la ecotoxicología ha desarrollado un nuevo enfoque metodológico basado en la medición de las respuestas bioquímicas, celulares, fisiológicas o comportamentales que pueden ser medidas en un organismo, a nivel de población o en una comunidad y sean reflejadas frente a un peligro potencial por uno o más contaminantes (Aitio et al. 1993; Depledge 1994). Cada una de estas

respuestas o biomarcadores, representa una señal integrada del nivel de contaminación de una determinada zona y, por consiguiente, constituye un indicador del nivel de riesgo toxicológico al que puede ser sometida una determinada población natural (Bayne et al. 1976; Bayne et al. 1985; Chambers et al. 2002). Las curvas dosis-respuesta se obtienen habitualmente en animales de experimentación expuestos a concentraciones diferentes de un contaminante. La figura 8 representa los diferentes niveles de riesgo al que puede estar sometido el medio ambiente y los organismos.

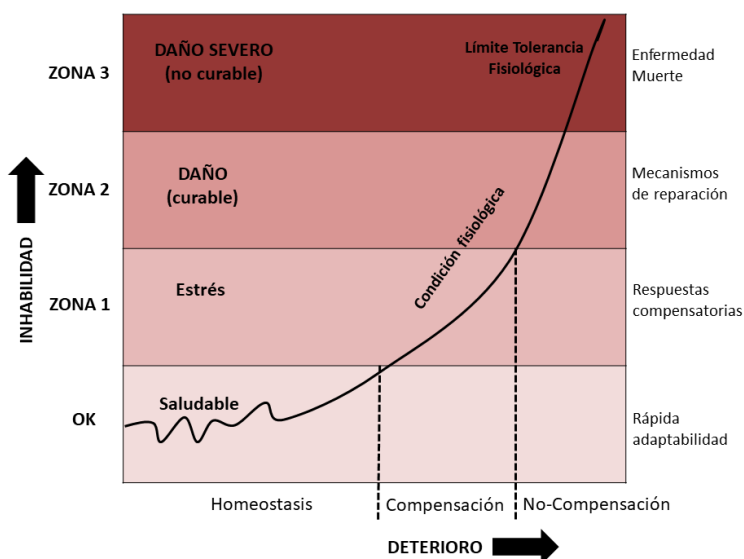


Figura 8. Diferentes niveles de riesgo al que puede estar sometido un organismo en el medio ambiente.

En este sentido, los *biomarcadores* son parámetros morfológicos, fisiológicos o bioquímicos que se pueden medir en los organismos y que varían cuando un determinado organismo se expone a una sustancia contaminante (Bayne et al. 1985). Un biomarcador debe ser específico para un compuesto o tipos de compuestos, detectable en pequeñas cantidades de muestras, medible por técnicas relativamente económicas, sencillas y reproducibles, asociado a una exposición anterior y predictivo para un estado de alteración reversible (Grandjean et al. 1994). De esta manera, los

biomarcadores permiten evaluar de forma temprana los efectos negativos de los contaminantes, sirviendo como herramientas de diagnóstico. No obstante, para que una evaluación ambiental o un programa de biomonitorización sean efectivos, se deberán utilizar múltiples biomarcadores que describan con exactitud los síntomas relacionados con la relación causa-efecto.

Atendiendo a su significado los biomarcadores se clasifican en tres tipos (Livingstone 1993; Walker et al. 1997; Timbrell 2001):

- **Biomarcadores de exposición** que indican la presencia de contaminantes, metabolitos derivados de su biotransformación o productos de su reacción con biomoléculas en fluidos biológicos o tejidos.
- **Biomarcadores de efecto** que son aquellos que muestran cambios bioquímicos tras la exposición a algún xenobiótico. Incluyen alteraciones bioquímicas, fisiológicas o de otro tipo en de los tejidos o fluidos corporales de un organismo.
- **Biomarcadores de predicción de riesgos o susceptibilidad** que predicen la posibilidad de una alteración grave a nivel de población, comunidad o ecosistema. Se refieren a las aptitudes inherentes o adquiridas específicamente por ciertos organismos a la exposición a xenobióticos.

De esta manera, los biomarcadores se pueden utilizar para:

- Indicar *a priori* problemas que se desarrollan en los recursos biológicos, antes que adquieran carácter crítico,
- Dilucidar las relaciones causa-efecto,
- Establecer tendencias espaciales de la contaminación,
- Definir cambios temporales de la contaminación y su relación con consideraciones reguladoras (por ejemplo, estándares de calidad),
- Identificar nuevos contaminantes en los ambientes acuáticos.

Los biomarcadores pueden ser agrupados en distintos niveles de organización: molécula, célula, organismo, y otros que se describen en la figura 9.

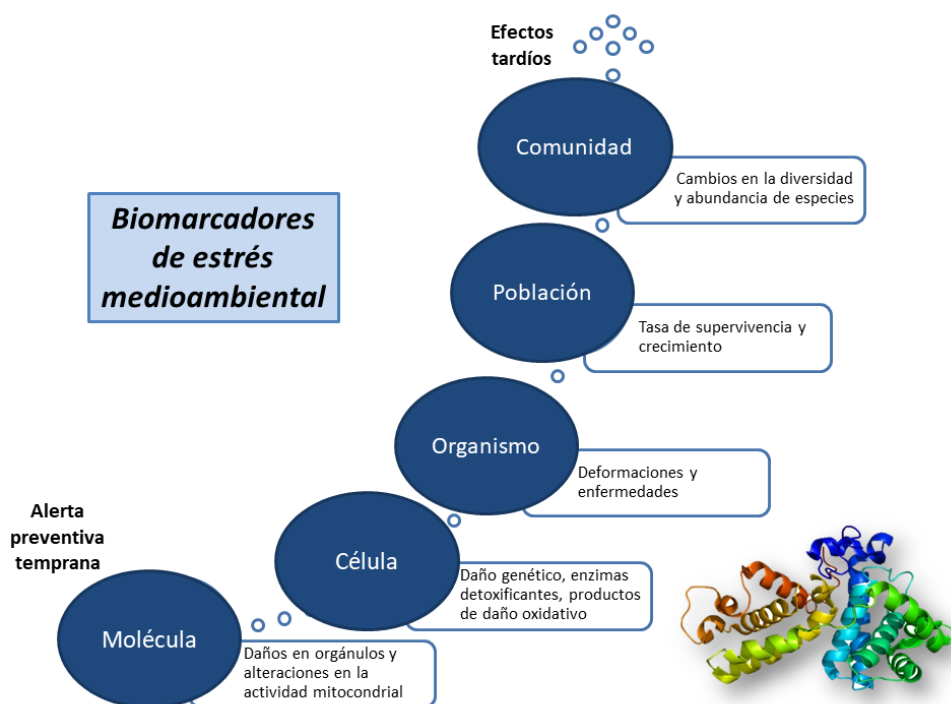


Figura 9. Parámetros utilizados como biomarcadores de estrés medioambiental.

Los biomarcadores moleculares son alertas tempranas, pues se alteran antes que los sistemas sufran daños irreversibles. Aquellos a nivel de población, comunidad o ecosistema aparecen de forma más lenta pero tienen mayor relevancia toxicológica (Livingstone 1993; Peakall 1994; Lopez-Barea 1995; Timbrell 2001). Por lo tanto, según qué nivel de complejidad se quiera analizar, se deben seleccionar diferentes biomarcadores. En la tabla 1 se indican algunos ejemplos de biomarcadores pertenecientes a distintos niveles de organización y los tipos y tiempos de respuestas biológicas a que dan lugar.

INTRODUCCIÓN

Biomarcador	Respuesta biológica	Nivel de organización	Aparición¹	Nivel de detección
Daño en el ADN	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
Aberraciones cromosómicas	ADN anormal	Subcelular	Media	Alto
Estabilidad lisosomas/ necrosis/ Genotoxicidad	Homeostasis	Subcelular	Tardía	Alto
Inmunosupresión/ Tumores	Mortalidad Individual	Celular	Tardía	Alto
Inmunocompetencia	Fagocitosis	Celular	Media	Moderado
Transformación celular	Necrosis/ Neoplasia	Celular	Tardía	Alto
Fecundidad/ Comportamiento	Cambios en la reproducción	Organismo	Tardía	Alto
Mortalidad	Cambios en la población	Población	Tardía	Alto
Diversidad	Disminución de la diversidad	Comunidad	Tardía	Alto

Tabla 1. Ejemplos de biomarcadores usados para la biomonitorización medioambiental.

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

El monitoreo abarca dos grandes objetivos: 1) describir el estado del medio ambiente, y 2) relacionar la causa y el efecto donde se produjo la degradación. Para cumplir con esos objetivos, los programas diseñados para monitorizar los efectos de los contaminantes pueden escogerse de una amplia gama de herramientas, desde muy específicos (biomarcadores) que ayudan al diagnóstico de la causa y del efecto, hasta bioindicadores relativamente no específicos. Teniendo en cuenta que los costos son un punto importante, y que los métodos de monitoreo deben ser aplicados repetidamente bajo condiciones estándares, se deben tener en cuenta las siguientes características con el fin de identificar biomarcadores útiles para evaluar la salud ambiental (Hodson 2002):

- **Capacidad para definir la relación causa-efecto:** se deben basar en mecanismos de efectos conocidos y con un alto grado de especificidad.
- **Relevancia:** los resultados deben ser relevantes para el medio ambiente y los administradores de recursos, y expresados en forma comprensible con umbrales que generen acciones de manejo.
- **Estado del desarrollo del método:** los métodos deben estar lo suficientemente desarrollados e investigados para ser aplicados.
- **Expresión de los resultados:** los resultados deben ser fácilmente comprendidos por el público y las autoridades ambientales.

En la última década se ha incrementado el desarrollo de biomarcadores basados en técnicas moleculares, sin embargo, se ha cuestionado la validez de su papel ecotoxicológico para evaluar el riesgo sobre la población o el ecosistema. Las ventajas y limitaciones de los biomarcadores frente a los análisis químicos convencionales se presentan en la tabla 2 (Bozo et al. 2007). El mayor obstáculo para desarrollar un buen biomarcador está en medir una respuesta selectiva en un solo organismo representante y poder extrapolar un ligero incremento o disminución del parámetro medido (un simple cambio bioquímico) a un nivel superior de organización y comprender su significado ecológico (Weeks 1998).

Ventajas	Limitaciones
Proveen una medida integrada de la biodisponibilidad de los contaminantes en el tiempo. Son el reflejo de la exposición a contaminantes ambientales.	Imposibilidad de controlar cambios en las variables ambientales. En algunos casos baja especificidad del biomarcador.
Ayudan a establecer la importancia de diferentes rutas de exposición. Permiten detectar la exposición a tóxicos y metabolitos rápidamente metabolizables y eliminados	En algunos casos no hay comprensión del mecanismo involucrado. Es necesario contar con experiencia técnica y equipos adecuados para obtener e interpretar los resultados.
Permiten la integración de interacciones de mezclas de contaminantes para rendir una expresión del efecto acumulativo a nivel molecular, celular o tisular. El potencial de integración en los diferentes niveles de organización biológica puede predecir los efectos ecológicos que se producirán a largo plazo.	

Tabla 2. Ventajas y limitaciones de los biomarcadores.

Para el monitoreo de exposición, los biomarcadores tienen la ventaja de reaccionar rápidamente a la exposición y así poder cuantificar únicamente los contaminantes biológicamente disponibles, y además son capaces de integrar los efectos de múltiples factores estresantes (Bayne et al. 1985). En general, los biomarcadores son sensibles a los contaminantes y rápidamente responden, ayudando a identificar los mecanismos básicos de las relaciones entre los contaminantes y sus efectos. En este sentido, los biomarcadores y los bioindicadores presentan ventajas y desventajas relacionada con su valor y uso para evaluar el efecto del estrés sobre los ecosistemas (Tabla 3).

Característica	Biomarcador	Bioindicador
Tipo de respuesta	Subcelular, celular	Individuo/Comunidad
Indicador primario de	Exposición	Efecto
Sensibilidad a los contaminantes	Alta	Baja
Relación con la causa	Alta	Baja
Variabilidad de la respuesta	Alta	Baja-moderada
Especificidad al contaminante	Moderada-alta	Baja
Tiempo de respuesta	Corto	Largo
Relevancia ecológica	Baja	Alta

Tabla 3. Características de los biomarcadores y los bioindicadores.

Los cambios en la expresión del ARNm, proteínas y metabolitos son dinámicos y solo muestran los valores en un cierto punto del tiempo, y por lo tanto, para una respuesta más integrada, se requiere el muestreo a diversos tiempos. Los datos obtenidos en diferentes puntos de tiempo pueden ayudar con la identificación de los verdaderos cambios específicos de toxicidad. El análisis de las muestras tratadas con diferentes dosis de tóxicos es también muy importante para la identificación de cambios específicos de toxicidad. Las dosis más altas pueden proporcionar una sensibilidad adicional que podría ayudar a la identificación inicial de efectos significativos, mientras que un análisis de muestras de baja dosis podría ayudar a establecer umbrales que deben superarse antes del inicio de la cascada de respuestas moleculares que conducen a un efecto adverso o tóxico.

La evaluación de biomarcadores en una muestra de organismos de una o más zonas sospechosas de contaminación, en relación con organismos procedentes de una zona control, permite establecer el peligro potencial al que están sometidas las comunidades objeto de estudio. Además, pueden indicar el efecto ecológico de un contaminante a largo plazo en función de la exposición o no del organismo, a un nivel de contaminación que sobrepasa los niveles de normal homeostasis o compensación (Underwood y Peterson 1988).

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

2.2. Técnicas de análisis masivo. Metodologías ómicas

El sufijo "-omics" se aplicó por primera vez para describir sistemas heterogéneos de objetos en la red por físicos e informáticos en la década de 1990 (Kuska 1998). Más tarde se convirtió en un término específico para describir la ciencia que abarca las disciplinas científicas de la genómica, la transcriptómica, la proteómica, la metalómica, la ionómica y la metabolómica (Lederberg y McCray 2001).

Los avances significativos logrados en las últimas décadas en la genética con la secuenciación de los organismos (Fleischmann et al. 1995), y en particular, con los desarrollos metodológicos que permitieron la secuenciación del genoma humano en el año 2000 (Lander et al. 2001), dio lugar a la aparición de otras técnicas "ómicas", todas ellas relacionadas con el estudio de la totalidad de algún tipo concreto de biomolécula (genes, transcritos, proteínas/metaloproteínas, metabolitos, etc) de un organismo, de gran utilidad para el estudio de las respuestas biológicas de del mismo frente a la exposición de factores externos estresantes.

En los últimos años, la metabolómica (basada en el estudio completo de los metabolitos implicados en diferentes procesos metabólicos de los organismos) se ha convertido en un campo emergente en bioquímica analítica y puede ser considerada como la última parte de la aplicación de las diversas ciencias ómicas. Todas estas disciplinas se organizan según la denominada “*cascada de las ómicas*” (Figura 10). Así, mientras que la genómica informa la probabilidad de que un proceso biológico pueda ocurrir, la metalómica y proteómica indican lo que provoca que ese proceso biológico suceda, y por último la metabolómica proporciona información sobre lo que realmente está sucediendo (García-Sevillano et al. 2014b). Es decir, la metabolómica es la ómica que mejor puede caracterizar los fenotipos de los seres vivos al estar más próxima a ellos. Esto se debe a que en los perfiles metabolómicos intervienen no solo la expresión de los genes sino también otros factores externos (exposición a metales, dieta y otros). De este modo, como el metaboloma viene determinado por el proteoma, este del transcriptoma y este a su vez del genoma, representa un nivel de organización más sensible que estos para comprender de forma global el resultado de un comportamiento biológico complejo. Por tanto, estas ciencias ómicas permiten comprender mejor las consecuencias de los mecanismos biológicos que se desencadenan en los organismos como consecuencia de la contaminación.

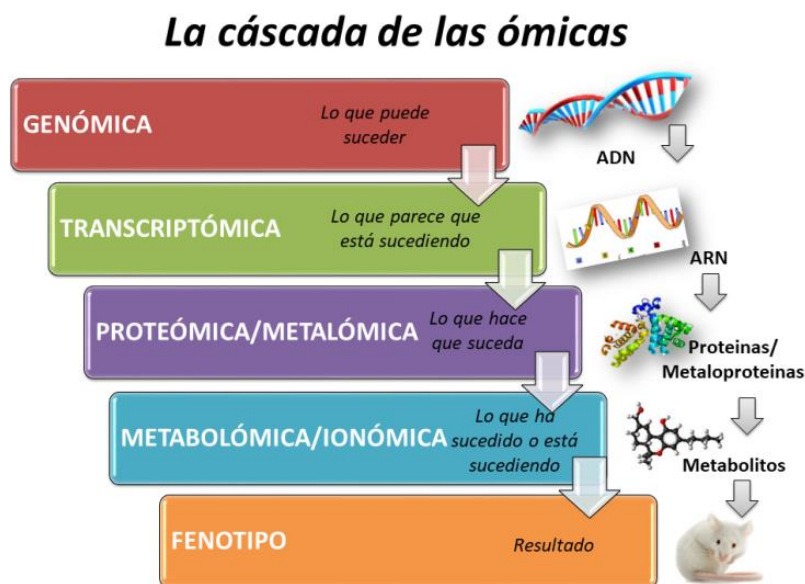


Figura 10. Representación esquemática de la cascada de las “-ómicas”.

La integración de todas estas -ómicas constituye una herramienta eficaz para conocer mecanismos de regulación y rutas metabólicas complejas en los organismos vivos, y además permite diagnosticar los cambios importantes a nivel celular y/o biológico provocados por la presencia de agentes externos, sin necesidad de disponer de un conocimiento previo sobre la toxicidad de estos (González-Fernández et al. 2008b).

La aplicación de estas metodologías ómicas a estudios de alteraciones de genes, ARN, proteínas, metabolitos y sus funciones en células u organismos expuestos a sustancias químicas ambientales, ha llevado a la aparición de un nuevo campo de investigación muy activo en la actualidad: las ciencias -ómicas ambientales.

2.2.1. Metodologías ómicas para estudios ambientales

Este campo tiene como objetivo aprovechar los grandes avances logrados en las técnicas ómicas, incluyendo la genómica, transcriptómica, proteómica, metalómica y metabolómica para un estudio más exhaustivo del medio ambiente, identificando las vías de toxicidad y los biomarcadores que permitan comprender los mecanismos de

toxicidad o modos de acción, y así poder identificar/categorizar/priorizar la respuesta de los organismos frente a la exposición tanto aguda como crónica a productos químicos en el medio ambiente y, a largo plazo, el desarrollo de procesos toxicológicos causados o influenciados por estas exposiciones.

El “workflow” o esquema de trabajo básico utilizado en los estudios *ómicos* ambientales se resume en la Figura 11. Este flujo de trabajo comprende varias etapas bien definidas. En primer lugar, el diseño experimental implica la selección de un organismo modelo o bioindicador (por ejemplo, peces, roedores, humanos, plantas, lombrices de tierra), y un tipo de contaminante (por ejemplo, metales), así como la vía de exposición adecuada para su administración. Además, los experimentos *ómicos* ambientales (en particular los basados en metalómica y metabolómica) implican otra serie de pasos, como son: muestreo de bioindicadores (en el caso de experiencias con organismos de vida libre), disección de órganos y extracción de fluidos biológicos, preparación de la muestra, en particular extracción de metabolitos o metalobiomoléculas, aplicación de la técnica adecuada de análisis, generalmente basada en espectrometría de masas inorgánica y orgánica, selección de la técnica de introducción de muestras en el espectrómetro de masas (infusión o introducción directa o con un paso previo de separación cromatográfica), tratamiento estadístico de los datos y finalmente interpretación biológica de los resultados. La selección de la técnica analítica es tan importante como la elección de un adecuado procedimiento de preanálisis. Por otra parte, la interpretación de los resultados requiere el uso de sofisticadas técnicas de análisis de datos, en las que el análisis estadístico multivariante desempeña un papel fundamental.

INTRODUCCIÓN

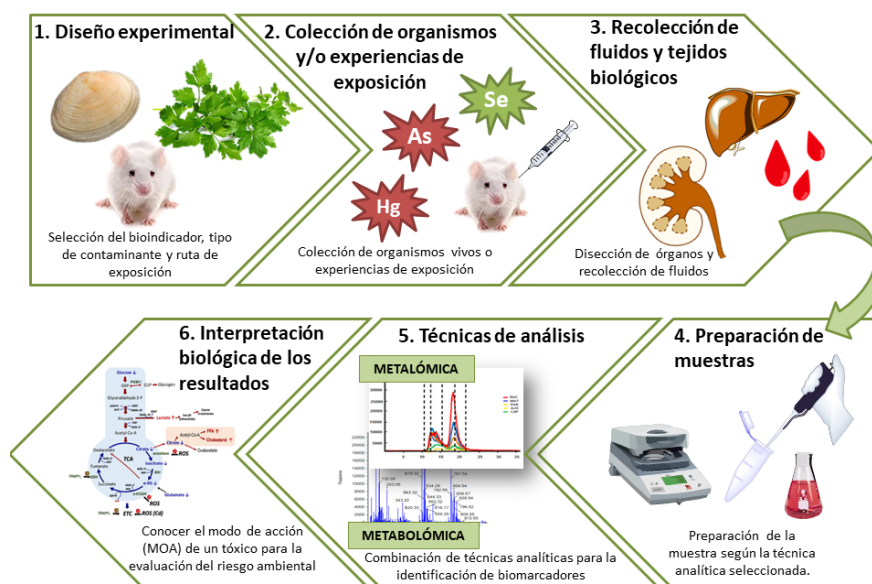


Figura 11. Esquema de trabajo típico que se aplica en los estudios ómicos medioambientales.

Actualmente, las metodologías ómicas medioambientales se centran en problemas y desafíos ambientales reales, como la caracterización de la respuesta biológica a mezclas de productos tóxicos químicos, la identificación de biomarcadores ambientales y de salud, y el desarrollo de ensayos innovadores. Estos estudios nos informan sobre la toxicidad de los elementos, los riesgos ambientales y la evaluación y utilización de los recursos naturales de forma que mantengan la salud humana y protejan el medio ambiente de manera sostenible. Además, permiten abordar numerosos desafíos que no se pueden estudiar adecuadamente utilizando las técnicas toxicológicas tradicionales, por ejemplo, la traslación de datos de toxicidad para determinar si los productos químicos afectarán a la salud humana, mediante consideraciones sobre especies y dosis de contaminantes (Contreras-Acuña et al. 2013).

Los estudios ómicos ambientales se pueden dividir en tres categorías. La primera se centra principalmente en el estudio de la toxicidad química de los elementos y monitorización ambiental permitiendo la evaluación de los ecosistemas. La segunda categoría considera los resultados adversos sobre la salud de los seres vivos,

mientras que la última categoría considera las funciones ecológicas. El objetivo común de estos enfoques es la identificación de los cambios moleculares, especialmente en los niveles de expresión de genes, transcritos, proteínas y metabolitos, en células o tejidos expuestos a contaminantes tóxicos, así como su relación con los cambios medioambientales y los efectos potenciales en la salud.

La genómica fue probablemente la primera técnica *ómica* que se aplicó a estudios de mecanismos de toxicidad, vías de toxicidad, y biomarcadores medioambientales. Estos estudios se centran en la presencia y niveles de compuestos químicos presentes en el medio ambiente, así como de sus mezclas, abordan la caracterización de los niveles de expresión de genes que se refleja en la abundancia del ARNm en una muestra biológica (Iwahashi et al. 2006). En estos estudios, la expresión de genes se utilizó para comparar los perfiles de expresión de grupos de genes con y sin exposición a sustancias tóxicas ambientales. Sin embargo, las respuestas de los transcritos no reflejan con total precisión las respuestas biológicas toxicológicamente relevantes debido a que hay cambios importantes en proteínas y metabolitos dentro de las células que no son detectables simplemente estudiando los niveles del ARNm. Por lo tanto, la proteómica y la metabolómica se usan a menudo para complementar la genómica en estudios toxicológicos y de salud (Kishi et al. 2006).

En este sentido, la genómica, proteómica y metabolómica han sido ampliamente utilizadas para estudiar los mecanismos de acción relacionados con los efectos carcinogénicos del arsénico (Tsuchiya et al. 2005). Otros autores también han estudiado los cambios en la expresión de biomoléculas inducidos en el ratón de laboratorio *Mus musculus* por la acción de ciertos metales tóxicos, como Cd (García-Sevillano et al. 2015a), As/Cd (García-Sevillano et al. 2014d) y Hg (García-Sevillano et al. 2014c). Finalmente, otros investigadores han aplicado estas técnicas a organismos de vida libre para la monitorización de la contaminación en zonas ambientales concretas de gran interés medioambiental, utilizando como bioindicadores tanto organismos terrestres, el ratón *Mus Spretus* (Abril et al. 2015)

como de entornos acuáticos, el bivalvo *Scrobicularia plana* (González-Domínguez et al. 2016) y el cangrejo de río *Procambarus clarkii* (Gago-Tinoco et al. 2014).

A partir de la comparación de los perfiles ómicos de células, tejidos y organismos con bases de datos que contienen los perfiles inducidos por tóxicos conocidos, se pueden identificar biomarcadores ambientales de toxicidad (Abraham et al. 2011).

En resumen, la biomonitorización de los problemas ambientales requiere la integración de distintos enfoques ómicos que abarquen las múltiples variables y factores que pueden contribuir en el comportamiento del ecosistema.

2.2.2. Metalómica y especiación química

Según la IUPAC, un análisis de especies químicas es la identificación y/o medida de las cantidades de una o más especies individuales en una muestra. Las especies químicas son las formas específicas de un elemento definidas por su composición isotópica, electrónica o estado de oxidación y/o complejo o estructura molecular (Templeton et al. 2000). En la actualidad, la especiación química es un tema de interés generalizado que deriva de la presencia de las especies químicas elementales en el medio ambiente, la salud y los alimentos, ya que la forma química en que se encuentre un contaminante determina su toxicidad, movilidad y biodisponibilidad.

Los procedimientos convencionales de especiación química, desarrollados durante los últimos veinte años están en la actualidad bien establecidos y pueden utilizarse de forma rutinaria en relación con temas medioambientales, salud y alimentos, entre otros. La mayoría de los procedimientos de especiación están relacionados con el estado de oxidación de los elementos o el análisis de compuestos organometálicos de baja masa molecular y de origen antropogénico, en los que el metal o metaloide se encuentra unido covalentemente a la molécula, así como sus productos de degradación medioambiental. Ejemplos típicos son la especiación de metilmercurio y mercurio inorgánico o bien las numerosas especies de arsénico que en ocasiones podemos encontrar en muestras biológicas. Estas especies químicas individuales

tienen un comportamiento diferencial en relación con su toxicidad, movilidad y biodisponibilidad. Un buen ejemplo es el As, en el que la toxicidad de los iones simples (As (III) y As (V)) es mayor que las formas orgánicas del elemento, como las especies metiladas (p. ej. ácidos metil arsónico [MA^v] y dimetil arsínico [DMA^v]) (Winski y Carter 1995; Lu et al. 2004).

Sin embargo, los iones o especies químicas metálicas, endógenas o exógenas, presentes en los sistemas biológicos pueden coordinarse a una gran variedad de ligandos, como oxalato, citrato, tartrato, aminoácidos y oligopéptidos o a moléculas de elevada masa molecular como proteínas, fragmentos de ADN o polisacáridos. Este enfoque más global de las especies químicas aumenta la complejidad de las metodologías analíticas aplicables que constituyen la base de otra ómica, la metalómica. Hay que tener en cuenta que aproximadamente un tercio de todas las proteínas precisan de la presencia de metales o metaloides como cofactores para desarrollar su función (por ej., Cu, Zn, Fe, Mn) (Tainer et al. 1991). En este sentido, los metales tienen un papel fundamental en la función de las proteínas, y en general en las funciones celulares y de los seres vivos.

Por tanto, puede decirse que la metalómica tiene su origen en la especiación química. El término “metaloma” fue introducido por Williams en 2001 quien se refirió a él como la distribución de los elementos, concentración de equilibrio de iones metálicos libres, en los componentes celulares, célula u organismo (Williams 2001). Este término se extiende a elementos metálicos y a las especies metálicas presentes en un sistema biológico, definido en cuanto a su identidad y/o cantidad (Szpunar 2004; Lobinski et al. 2010).

Actualmente, la IUPAC define la metalómica como “el estudio del metaloma y de las interacciones y conexiones funcionales de las especies metálicas con los genes, proteínas, metabolitos y otras biomoléculas en los sistemas biológicos” (Lobinski et al. 2010).

A diferencia del resto de ciencias ómicas, la metalómica presenta una elevada heterogeneidad química y funcional debido a la gran diversidad de metaloespecies existentes (Mounicou et al. 2009), como se observa en la Figura 12. Entre estas especies metálicas destacan las metaloproteínas, las cuales pueden contener un heteroelemento enlazado covalentemente (ej: selenoproteínas) o un centro metálico unido por coordinación. El segundo gran grupo de metaloespecies son los metalometabolitos, entre los que se incluyen complejos metálicos con ligandos orgánicos (ej: aminoácidos, ácidos orgánicos), metabolitos con un elemento metaloide covalentemente incorporado (ej: As, Se) y otros compuestos exógenos como metalofármacos. Por tanto, teniendo en cuenta la multiplicidad de metalo-moléculas existentes, y la relevancia de las mismas en los sistemas químicos y biológicos, la metalómica se ha convertido en un área de investigación multidisciplinar con un gran potencial en numerosos campos, como la biología clínica, química medioambiental, geoquímica, nutrición y farmacología, entre otros (Mounicou et al. 2009).

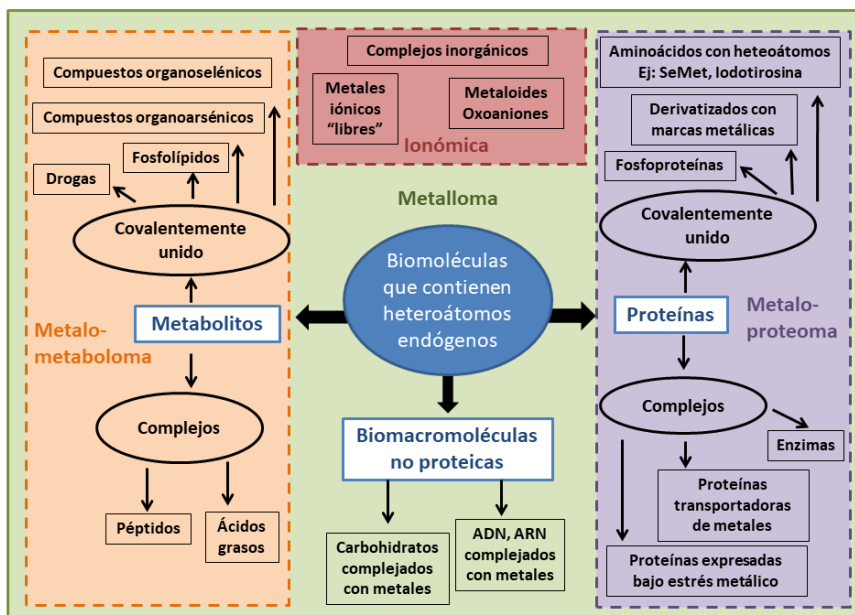


Figura 12. Representación esquemática de las biomoléculas que contienen un heteroelemento endógeno (Lobinski et al. 2006).

Además hay que considerar otros términos relacionados con la metalómica que han sido propuestos para designar los estudios relacionados con el comportamiento de los metales traza en los sistemas vivos, como la metalometabolómica (asociado a la función de los metales en los procesos metabólicos), ionómica (Salt 2004) (metales, metaloides y especies no metálicas presentes en el organismo) y metaloproteómica, en la cual la presencia del metal (heteroátomo) permite el seguimiento de los procesos en los que están involucradas estas proteínas (Sanz-Medel 2004). Este heteroátomo puede estar presente en la proteína de forma natural o incorporado como marcador en la misma.

La presencia de metales tóxicos, como As, Cd y Hg en los organismos puede bloquear los grupos funcionales de las proteínas, desplazar y/o sustituir metales, inducir cambios conformacionales en estas y desnaturalizar o inactivar enzimas, además de provocar estrés oxidativo en los organismos (Hall 2002; Matés 2002; Rahman 2007).

Sin embargo, el principal problema en el análisis de estas metaloespecies es la identificación mediante espectrometría de masas orgánicas, ya que se precisa una gran pureza en la muestra, lo que implica una exhaustiva y compleja etapa de purificación. Otro problema añadido es la concentración del metal en estudio, ya que numerosos elementos traza endógenos en sistemas biológicos está por debajo o en el rango ng/g, y a su vez distribuido entre varias especies, en las que la contribución del metal al total de la estructura es insignificante en términos de masa. En otros casos, las especies están en librerías de espectros, pero la disponibilidad de patrones de calibración es imposible. Algunas veces la baja estabilidad del complejo hace que la preparación de la muestra y análisis sean mucho más complejos con el fin de preservar la unión metal-biomolécula (Gómez-Ariza et al. 2004; Lobinski et al. 2006).

2.2.2.1. Especiación química de Arsénico

El arsénico está catalogado como sustancia potencialmente peligrosa debido a su alta persistencia y elevado potencial de bioacumulación y toxicidad (Rahman et al. 2014). Este elemento presenta varios estados de oxidación (+III, +V, 0, -III) y una gran variedad de formas inorgánicas y orgánicas. La figura 13 muestra las formas de As más abundantes en el medio ambiente (Leermakers et al. 2006). Numerosos estudios de toxicidad de As han demostrado que las diferentes formas químicas del arsénico exhiben diferentes toxicidades.

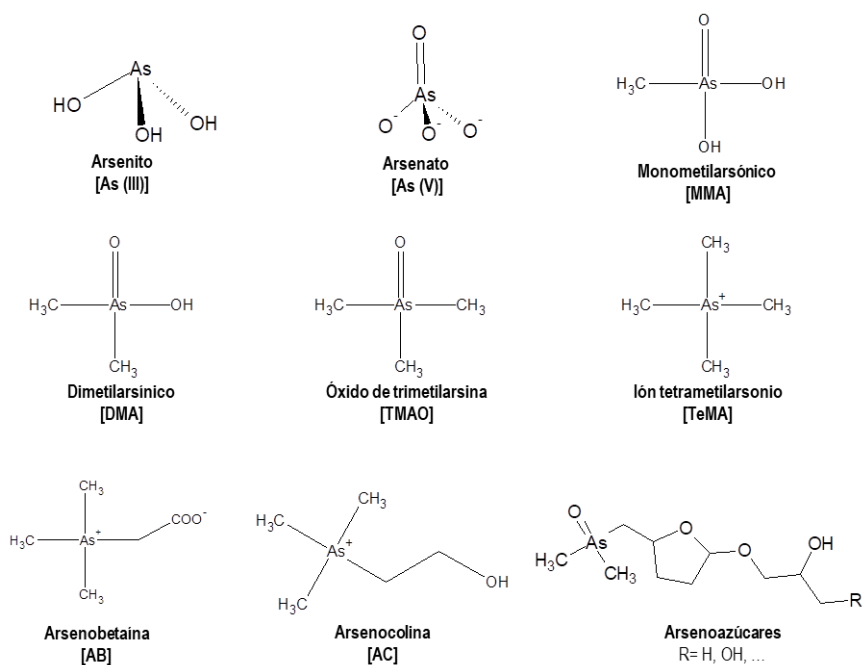


Figura 13. Estructura de los compuestos de As más abundante en la naturaleza.

De todas las especies que se muestran en la Figura 13, las especies inorgánicas son más tóxicas que las orgánicas. En este sentido, la toxicidad aguda generalmente disminuye con el creciente grado de metilación, a excepción del ión tetrametilarsonio (TeMA) (Tabla 4).

Especies de arsénico	LD ₅₀ (g/kg)
As(III)	0.0345
MMA	1.2
DMA	1.8
TeMA	0.89
TMAO	10.6
AsC	> 6.5
AsB	> 10

Tabla 4. Valores experimentales de LD₅₀ para diferentes especies de As (Shiomi 1994).

Desde este punto de vista, el análisis del contenido total de arsénico en las muestras es insuficiente para completar los estudios de evaluación del riesgo toxicológico de este elemento (Tchounwou et al. 2004), siendo necesario utilizar un método de especiación química adecuado, sensible y preciso.

El primer estudio de la separación de las especies de As fue realizado por Braman y Foreback (Braman y Foreback 1973), utilizando la capacidad de las especies de As para formar hidruros volátiles y sus diferencias en los puntos de ebullición. La fase de vapor de los hidruros (arsinas) formados se concentraban por atrapamiento criogénico y se liberaban sucesivamente de la trampa al aumentar gradualmente la temperatura.

Se sabe que los alimentos de origen marino son la principal fuente de As en la dieta humana (Francesconi 2010), y en consecuencia el consumo total de arsénico depende de la ingesta de este tipo de alimentos. El As presente en pescados y mariscos se encuentra en diversas formas químicas con diferente toxicidad, desde la forma más tóxica, el arsenito (As^{III}) y arseniato (As^V) a las especies metiladas, las cuales presentan un carácter moderadamente tóxico como el ácido metilarsónico (MMA^V) y ácido dimetilarsínico (DMA^V) (Fattorini y Regoli 2004; Fattorini et al. 2006). Por el contrario, la arsenobetaina es prácticamente inocua. Por tanto, la toxicidad, acumulación e implicaciones del arsénico en el metabolismo de los organismos vivos

suele depender de la forma química en las que el elemento está presente (Vahter 1999).

En los seres humanos, los compuestos de arsénico pueden ser absorbidos fácilmente por tractos intestinales y transportados al torrente sanguíneo. Se ha descrito que la absorción respecto a la dosis es del 50% para As (III) y más del 95% para arsenobetaina y arsenocolina (Vahter 1999). En el cuerpo humano, el arsénico inorgánico (iAs) se metaboliza a formas metiladas: el As (V) es reducido a As (III) y luego metilado por adición oxidativa. La principal especie es el DMA, sin embargo, la vía metabólica puede continuar hasta la formación de especies trimetiladas. Algunos autores han identificado DMA y MMA en muestras de orina de individuos que consumen una gran cantidad de mariscos cuyo contenido de especies de arsénico: 10-30% de arsénico inorgánico, 10-20% MMA y 55-80% DMA (Le 2000). Además, otros estudios han demostrado que la proporción de compuestos de arsénico en la orina puede variar con la edad, hasta un 50% más en niños que en adultos (Lezcano et al. 2007). Cuando el arsénico proviene del consumo de algas, mejillones, u otros organismos marinos, cuyo contenido en arsenozúcares es mayor, se metaboliza a DMA y la proporción de este compuesto aumenta significativamente (Le et al. 1994; Francesconi 2010). Por tanto, el DMA es el principal metabolito producido a partir del arsénico, y los intermedios producidos durante la síntesis de DMA se cree que desempeñan un papel fundamental en el modo de acción tóxica del arsénico (Vahter 2002). La biometilación de iAs ha sido considerada como un mecanismo de detoxificación de As durante las últimas décadas. Sin embargo, aunque algunas especies han sido consideradas como inocuas, como es el caso de los arsenozúres, el metabolismo de los mamíferos que las ingieren las convierte en arsenicales que sí lo son, como el DMA.

Mediante los procedimientos de especiación es posible determinar las diversas formas químicas de un elemento (tanto atómicas como moleculares), las respuestas específicas que los sistemas vivos dan a la presencia o ausencia de cada especie, y la participación en procesos de asimilación de nutrientes por vía intra- y extracelular.

Por lo que la especiación se ha convertido en una potente herramienta que nos permite profundizar en el estudio de cada elemento y en sus diversos comportamientos químicos, siendo posible conocer en cada caso las propiedades, singularidades y posibles interacciones en el medio ambiente. Todo ello es aplicable a otras áreas de estudio, como la tecnología, la industria, la toxicología, la biología o la medicina, entre otras.

Existen ciertos aspectos que se deben tener en cuenta a la hora de desarrollar un método de especiación química, fundamentalmente si se trata de muestras biológicas complejas, ya que existen algunas dificultades que es necesario considerar. Estas son fundamentalmente, la estabilidad termodinámica de los compuestos, que no es siempre la misma, ya que depende de la propia matriz, y en segundo lugar, la cinética de transformación de las diversas especies. A menudo el tiempo durante el que los analitos son estables no sobrepasa unas pocas horas y siempre en condiciones de refrigeración, por lo que es vital para el buen desarrollo del análisis que este se ajuste lo más posible al tiempo de vida de la especie en cuestión.

Por otro lado, en los organismos vivos el arsénico se encuentra a menudo en concentraciones muy bajas (μgL^{-1} o ngL^{-1}) y en forma de especies desconocidas, de las que no hay patrones para su confirmación. Esto supone dos grandes retos que se debe afrontar a la hora de llevar a cabo los procedimientos de especiación, el primero de ellos implica el empleo de técnicas analíticas mucho más sensibles (Łobiński et al. 1998; Donard y Ritsema 2008). El segundo obliga al uso de espectroscopía de masas orgánicas para la identificación de los desconocidos (Contreras-Acuña et al. 2013).

Otro inconveniente va unido a la ausencia de materiales de referencia certificados que permita la validación de los métodos que se desarrollen y su intercomparación.

2.2.3. Proteómica

El proteoma es el conjunto de proteínas expresadas por el genoma, que refleja la presencia y actividad de todas las proteínas en una célula, tejido y organismo (Zhnag et al. 2019). Los niveles de expresión de proteínas son el equilibrio entre la transcripción, traducción y degradación de las mismas en las células, incluyendo las diferentes etapas de transcripción y maduración de proteínas y la modificación que experimentan. El genoma es estable desde el punto de vista formal, pero la cantidad y los tipos de proteínas expresadas por el genoma varían según la condición ambiental (Zhnag et al. 2019). Por tanto, la proteómica es el análisis global del conjunto de proteínas en una célula, tejido u organismo, su localización, estructura, estabilidad e interacción (Anderson y Anderson 1998; Blackstock y Weir 1999; Snape et al. 2004), y proporciona información adicional y complementaria a los estudios transcriptómicos, que establece la conexión entre las secuencias genómicas y las proteínas codificadas, utilizando la información contenida en el conjunto de moléculas de ARNm o transcritos producidos en una célula o una población de células (Singh y Nagaraj 2006).

Esta puede dividirse en *proteómica de expresión*, que tiene como objetivo la descripción del proteoma total de un tejido, fluido, tipo celular u orgánulo y las mediciones cuantitativas de los niveles de expresión proteínica, y *proteómica funcional*, que se encarga del estudio de la función de proteínas dentro de sistemas biológicos (relaciona cambios de expresión con una función determinada) y la regulación de su expresión, incluyendo las interacciones proteínas-proteína, proteínas-ADN, proteínas-ARN y las modificaciones post-traduccionales.

Como metodología *-ómica*, la proteómica proporciona una evaluación amplia e integral de los mecanismos tóxicos y defensivos provocados por los contaminantes sin necesidad de ningún conocimiento previo de su mecanismo de toxicidad. Estas aproximaciones proteómicas nos permiten identificar las proteínas que se alteran de manera significativa en un organismo después de exposición a la contaminación y

pueden ayudar a revelar su mecanismo de toxicidad. Además, estas proteínas, una vez identificadas, pueden ser utilizadas como nuevos biomarcadores en la biomonitorización de los ecosistemas (García-Sevillano et al. 2014b).

Por tanto, la proteómica es una herramienta efectiva para evaluar los efectos tóxicos de los contaminantes y ha sido utilizada en numerosos estudios de contaminación en sistemas estuáricos, combinada con otras técnicas ómicas, identificando alteración en los niveles de algunas proteínas y permitiendo determinar mecanismos toxicológicos en el bivalvo *Scrobicularia plana* en respuesta a la contaminación metálica, incluyendo estrés oxidativo, fallo en la estructura del citoesqueleto, regulación anormal de los ciclos celulares o alteraciones en el metabolismo celular y el transporte, entre otros (González-Domínguez et al. 2016). Otros autores también han llevado a cabo estudios proteómicos para evaluar la contaminación en el Parque Nacional de Doñana, un espacio natural protegido de gran interés por su biodiversidad biológica situado al suroeste de la Península Ibérica. Dichos estudios se han llevado a cabo en ecosistemas acuáticos, empleando el cangrejo de río *Procambarus clarkii* (Vioque-Fernández et al. 2009), y en medio terrestre el organismo de vida libre *Mus spretus* (Montes-Nieto et al. 2007).

Finalmente, la proteómica redox es una rama emergente en el campo de la proteómica, dirigida a cuantificar los cambios redox dentro del proteoma, relacionados con los procesos de señalización redox desencadenados por el estrés oxidativo (Rinalducci et al. 2008). En los últimos años, se han logrado diversos avances en este campo de estudio que permiten la evaluación de proteínas alteradas en condiciones de estrés. Las alteraciones en el estado redox de las proteínas son críticas para regular la expresión de las proteínas. Por lo tanto, la identificación de estas proteínas y sus modificaciones son de especial interés en estudios de exposición a especies contaminantes (García-Sevillano et al. 2014a; Morales-Prieto y Abril 2017; Morales-Prieto et al. 2018).

2.2.4. Metabolómica

La metabolómica se define como el estudio del conjunto de todos los metabolitos de un sistema biológico, también denominado metaboloma, y de los cambios metabólicos observados en respuesta a una perturbación genética o medioambiental (Nicholson et al. 1999). El metaboloma está compuesto por un elevado número de metabolitos (moléculas biológicas con un peso molecular inferior a 1500 Da) de tipo intra- y extracelulares, los cuales participan directamente en procesos metabólicos. El papel central que los metabolitos juegan en la biología de los sistemas confiere una serie de ventajas a la metabolómica frente a otras ciencias *ómicas*, las cuales pueden resumirse en los siguientes puntos (Dunn et al. 2011):

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

Además, los estudios metabolómicos se pueden abordar de dos formas diferentes, en los casos en los que se conozca el número y tipo de metabolitos de interés, se puede realizar un enfoque dirigido (*target analysis*), o también conocido como estudio de perfiles (profiling), siendo su objetivo la identificación y cuantificación de un determinado grupo de metabolitos preestablecidos. El hecho de conocer de antemano los metabolitos de interés es de gran ayuda a la hora de escoger el mejor método para su detección, ya que desde el principio se puede optimizar tanto el método de extracción como la técnica analítica a utilizar para el análisis. Este enfoque requiere la comparación de los analitos con patrones comerciales, por lo que depende de la disponibilidad de dichos estándares. Por el contrario, en los casos en los que no se tenga información previa acerca de los metabolitos que puedan estar implicados en un proceso biológico/bioquímico en concreto, se lleva a cabo mediante enfoque no dirigido (*non-target analysis*) (Kaderbhai et al. 2003; Dunn y Ellis 2005; Ogra y Anan 2012). La desventaja de la metabolómica no dirigida es que en este enfoque se lleva a cabo una cuantificación relativa, no absoluta. Además, en algunos casos los picos no son identificables (Bouhifd et al. 2013).

Dentro de estos dos grandes enfoques metabolómicos, podemos distinguir diferentes estrategias de análisis (Kaderbhai et al. 2003; Dunn y Ellis 2005): i) *Metabolite profiling o perfil metabólico*: identificación y cuantificación de un número seleccionado de metabolitos predefinidos, generalmente relacionados con una vía metabólica específica, (ii) *metabolic fingerprinting o huella dactilar metabólica*: análisis de muestras rápido, global y de alto rendimiento para proporcionar su clasificación, generalmente sin cuantificación e identificación metabólica, (iii) *metabolite footprinting o huella pedicular metabólica*, el estudio de metabolitos en fluidos extracelulares, y otros que dependen de los objetivos del estudio: (iv) *metal-metabolomic*, estudio de metabolitos con contenido metálico o metaloide en un sistema biológico (por ejemplo, selenometabolómica). La figura 14 muestra un esquema sobre los diferentes tipos de enfoques metabolómicos.

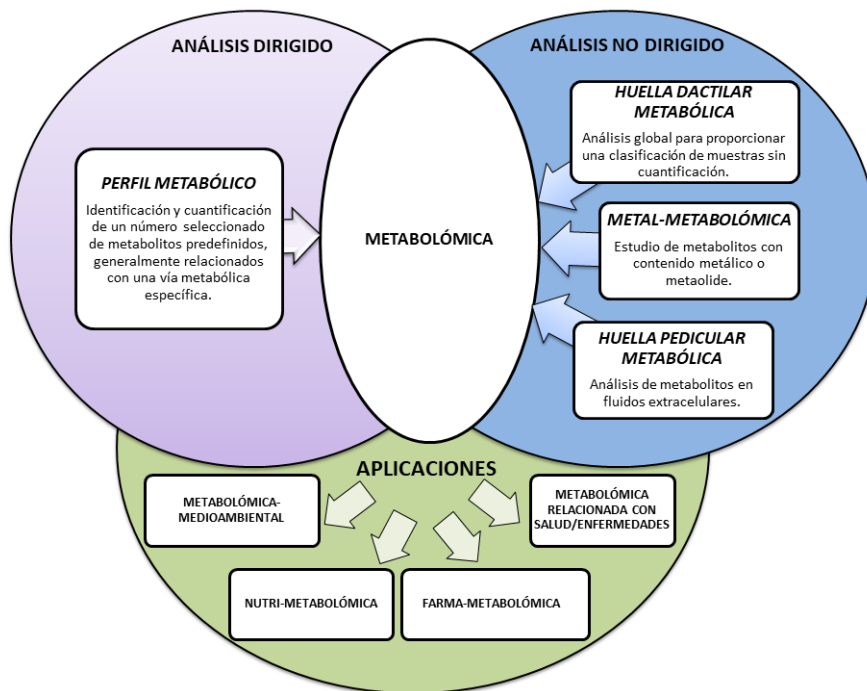


Figura 14. Representación esquemática de los diferentes enfoques metabolómicos.

No obstante, la metabolómica es aún una ciencia emergente con algunas limitaciones importantes. El principal reto de la metabolómica es el desarrollo de metodologías capaces de determinar el mayor número posible de metabolitos en un solo análisis. Mientras que los análisis genómicos, transcriptómicos y proteómicos están dirigidos a moléculas con una gran analogía estructural (ADN/ARN y proteínas son polímeros compuestos por 4 nucleótidos y 22 aminoácidos, respectivamente), el metaboloma presenta una gran complejidad que dificulta su medición e identificación (Beecher 2003). En primer lugar cabe destacar la heterogeneidad química de los metabolitos presentes en cualquier muestra biológica, entre los que pueden encontrarse lípidos, ácidos orgánicos, alcoholes y otros muchos compuestos. Además, el metaboloma está compuesto por metabolitos procedentes de diversas fuentes, incluyendo metabolitos endógenos (sintetizados y metabolizados en el organismo), exógenos (*ej:* fármacos, nutrientes), así como metabolitos procedentes de la interacción entre distintos organismos (por ejemplo, microflora intestinal). Esta diversidad en la

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

A pesar de estas limitaciones, la metabolómica ha demostrado una gran aplicabilidad en numerosos campos gracias a su potencial para caracterizar fenotipos complejos afectados por diversas condiciones anormales. Así, algunas de las aplicaciones más relevantes son el estudio de los mecanismos de acción de tóxicos (Nicholson et al. 1999), la metabolómica medioambiental (Bundy et al. 2008a), y las aplicaciones biomédicas relacionadas con el estudio de los mecanismos subyacentes a la patología de las enfermedades, el descubrimiento de posibles biomarcadores y el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos (Lindon et al. 2004).

Por otro lado, un paso crucial en metabolómica es conseguir una adecuada extracción de los metabolitos de la muestra para recuperar la mayor cantidad posible de los fluidos o tejidos biológicos, incluyendo suero, plasma, tejido homogeneizado, saliva, orina, etc. Por este motivo, la preparación de la muestra es un factor clave en el éxito de cualquier procedimiento analítico, ya que afectará al contenido final de los metabolitos en la muestra purificada, y por consiguiente, a la interpretación biológica de los resultados obtenidos en el estudio (Putri et al. 2013). En general, un solo método de extracción no es capaz de aislar todos los metabolitos de la muestra, por lo que el procedimiento de extracción debe ser desarrollado y verificado para cumplir con los objetivos del experimento. Así, el análisis de fluidos biológicos se realiza normalmente después de un paso de precipitación de proteínas (Zhang et al. 2012),

mientras que los tejidos requieren una lisis previa de las células, combinando un homogenizador específico con un simple protocolo de extracción basado en el uso de mezclas de disolventes (Römisch-Margl et al. 2012). Lo ideal es que la extracción de metabolitos provoque de manera eficiente la liberación de los metabolitos de la muestra, eliminación de posibles interferencias que puedan afectar al análisis (por ejemplo, proteínas y sales) haciendo que el extracto sea compatible con la técnica analítica utilizada (Yanes et al. 2011). En el caso de análisis no dirigidos estos procedimientos de preparación de muestras deben: (a) extraer el mayor número de metabolitos, (b) ser no selectivos y no excluir moléculas en base a sus propiedades físicas o químicas, y (c) no ser destructivos ni provocar la transformación de unos metabolitos en otros como consecuencia, por ejemplo, del uso de reactivos oxidantes (Vuckovic 2012). La mayor parte de las estrategias descritas en la bibliografía se basan en el uso de extracciones secuenciales bajo ciertas condiciones para la recuperación selectiva de diferentes familias o clases de metabolitos, como los lípidos (Watson 2006), o metabolitos solubles en agua (Sun et al. 2007), en relación con ciertos biomarcadores potenciales en el rango de masas entre 50 y 1000 m/z. En particular, en estudios de *fingerprinting* el tratamiento al que se somete la muestra debe ser lo más simple posible para evitar pérdidas y aumentar la reproducibilidad.

Por otro lado, cuando los metabolitos se encuentran a bajas concentraciones en los extractos, las muestras se pueden concentrar por condensación, extracción por solvente, filtros centrífugos de corte, columna de extracción, o utilizando el concentrador "speedvac". Sin embargo, para muchos metabolitos, el inconveniente para su análisis por MS no es su concentración en las muestras biológicas, sino su bajo rendimiento en la separación cromatográfica en GC o inadecuada ionización en MS (Zhou et al. 2012). En este sentido, la derivatización se ha utilizado frecuentemente en el análisis mediante GC-MS para mejorar la separación, detección y sensibilidad de ciertos metabolitos (García-Sevillano et al. 2014a). En general, las reacciones de derivatización se desarrollan en base a los grupos funcionales, tales como amino, carbonilo, carboxilo y restos hidroxilo de los metabolitos (Jia et al. 2011).

Por lo tanto, la metabolómica es en la actualidad una poderosa herramienta para los estudios ambientales, no solo para evaluar la influencia en los organismos vivos de los cambios en las variables convencionales, como la temperatura, el agua, la disponibilidad de alimentos, la salinidad, ciclos luz/oscuridad, los gases atmosféricos y otros factores estacionales, sino también para caracterizar las interacciones de los xenobióticos con los organismos vivos (Bundy et al. 2008a). En este sentido, los procedimientos metabolómicos pueden aplicarse a organismos de vida libre o en experiencias de exposición, para comprobar que contaminantes pueden causar un efecto crónico o conocer el modo de acción (MOA) de un tóxico a nivel metabólico como parte de la evaluación del riesgo ambiental.

2.2.5. Ionómica. Homeostasis de metales

El ionoma se define como la composición de nutrientes minerales y elementos traza de un organismo y representa la composición inorgánica de fluidos celulares, tejidos o fluidos biológicos (Harper et al. 2003). La ionómica aborda la medida cuantitativa y simultánea de la composición elemental de los organismos vivos y de los cambios en esta composición como respuesta a estímulos fisiológicos, estado de desarrollo y modificaciones genéticas (Sun et al. 2007).

En este campo, la tecnología ICP-MS juega un importante papel debido a sus capacidades multielementales, la alta sensibilidad (los iones metálicos y especies de los elementos suelen estar presentes en los organismos en el orden de picogramos o nanogramos por mL o mg de concentración) y mínima cantidad de muestra necesaria para llevar a cabo el análisis. Estas ventajas lo hacen imprescindible en estudios que involucran a pequeños mamíferos, como el ratón de laboratorio *Mus musculus* o el bivalvo *Scrobicularia plana*. Después de la determinación multielemental en diferentes tejidos y fluidos biológicos, los resultados obtenidos se deben someter a estudios estadísticos que nos permitan discriminar entre los diferentes grupos de estudio.

La ingesta de metales en ratones y otros mamíferos sigue un esquema de flujo bien establecido, que inicialmente depende de la vía de entrada, por ejemplo, oral, dérmica o subcutánea e inhalación, pero que finalmente llegan al torrente sanguíneo donde se transportan continuamente a los distintos órganos mediante diferentes proteínas transportadoras, donde cruzan la membrana celular y se produce un ensamblaje específico metal-biomolécula, con funciones biológicas específicas.

En este sentido, la homeostasis es el conjunto de fenómenos de autorregulación, conducentes al mantenimiento de una relativa constancia en la composición y las propiedades del medio interno de un organismo. Si este flujo es alterado por la presencia de metales tóxicos o contaminantes, el animal puede sufrir problemas de salud e incluso la muerte.

Por esta razón, el estudio de la concentración de metales en diferentes órganos y fluidos biológicos, como hígado, riñón, cerebro, corazón, pulmón, testículos y suero es de gran interés ya que nos da información sobre la distribución de los mismos entre los diferentes órganos. Estos estudios nos proporcionan información sobre posibles procesos de homeostasis para regular las concentraciones de metales entre los distintos órganos, por ejemplo, desde órganos dianas de vital importancia en el funcionamiento de los seres vivos, hasta otros con una mayor actividad metabólica que desempeñen un papel fundamental en los procesos de detoxificación.

La aplicación de la ionómica a muestras de riñón en ratones *Mus spretus* capturados en dos zonas sometidas a diferente contaminación ha permitido discriminar entre zonas de mayor y menor contaminación, analizando la concentración de varios metales en este órgano (Salt et al. 2008). En este estudio, los resultados mostraron un alto nivel de metales tóxicos, tales como Cd, As, Ni, Cr y Pb en la zona de mayor contaminación (García-Sevillano et al. 2012).

2.3. El papel de la espectrometría de masas en las ómicas

La espectrometría de masas (MS) es una de las tecnologías analíticas clave en las que se basan los enfoques *ómicos*. Se trata de una herramienta analítica para medir las relaciones de masa/carga (m/z) y en consecuencia su masa molecular (MW). Esta técnica puede proporcionar la detección y cuantificación de miles de compuestos y la determinación estructural y propiedades químicas de estas moléculas, incluso a niveles de ultratrazo.

Los espectrómetros de masas tienen siete componentes comunes: sistema de introducción de muestra, fuente de iones, analizador de masas, detector, sistema de vacío, sistema de control y sistema de tratamiento de datos. De esta manera, el proceso comprende cuatro etapas generales: i) entrada de la muestra, ii) conversión de moléculas en iones por la fuente de ionización, iii) separación de iones por sus valores m/z a través de campos magnéticos o eléctricos a través del analizador de masas, iv) detección de los iones separados con carga eléctrica obteniendo una señal eléctrica proporcional a la abundancia de cada especie. La figura 15 muestra los componentes básicos de un sistema de MS.

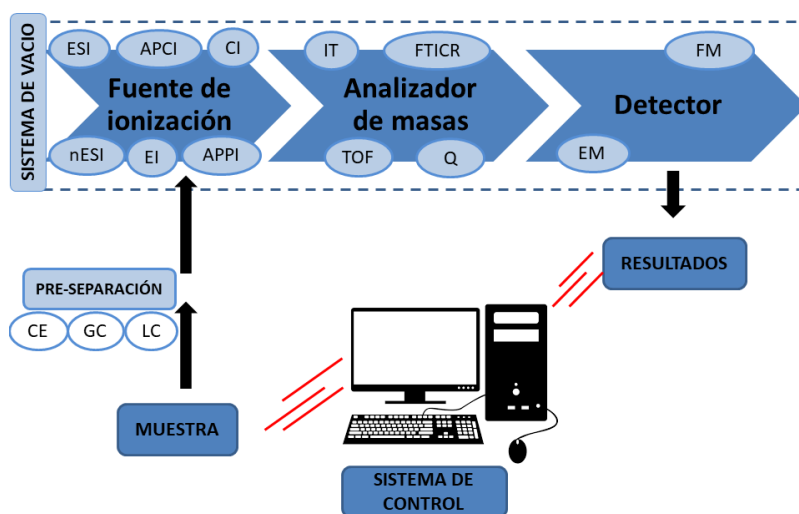


Figura 15. Configuración básica de un espectrómetro de masas.

El sistema de introducción de muestra, junto con la fuente de ionización y el tipo de analizador de masas definen el tipo de espectrómetro y sus capacidades.

➤ Fuentes de ionización:

- **Impacto electrónico (EI):** los analitos son ionizados mediante una corriente de electrones emitidos desde un filamento que al interactuar con los compuestos en fase gaseosa provoca la formación de radicales por la pérdida de un electrón. Además, el empleo de una alta energía de ionización (normalmente 70 eV) provoca que el proceso de ionización vaya acompañado por la fragmentación de los analitos, los cuales son característicos de cada metabolito y facilita la identificación de los compuestos mediante el empleo de librerías.
- **Ionización química (CI):** puede emplearse para determinar el ion molecular, el cual se encuentra habitualmente ausente con la técnica descrita anteriormente (EI-MS) debido a que provoca una gran fragmentación de la molécula.
- **Electrospray (ESI):** posee una elevada sensibilidad y una alta capacidad para ionizar compuestos en un amplio rango de masas y polaridades. En la fuente ESI, la ionización de los metabolitos se produce mediante reacciones ácido-base (ej. $[M+H]^+$, $[M-H]^-$) o de coordinación (ej. $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Cl]^-$, $[M+HCOO]^-$), y posteriormente tiene lugar la electro-nebulización para liberar los iones desolvatados. La ionización por electrospray normalmente opera a flujos de introducción de muestra de $\mu\text{L min}^{-1}$, pero la modalidad de nanoelectrospray (nESI) permite introducir menores caudales de muestra (nL min^{-1}), lo que facilita el proceso de desolvatación y mejora la sensibilidad (Boernsen et al. 2005). Esta técnica de ionización origina iones cargados positiva o negativamente dependiendo del potencial eléctrico aplicado y de las

propiedades físico-químicas de los metabolitos, por lo que permite la determinación de un mayor número de metabolitos.

- **Ionización química a presión atmosférica (APCI):** la fase móvil utilizada se vaporiza e ioniza mediante una descarga, generándose iones reactivos que pueden transferir su carga a los metabolitos en fase gaseosa. Esta técnica de ionización es complementaria a la ESI, ya que es más adecuada para el análisis de compuestos de menor polaridad y además es menos susceptible a los efectos de la matriz.
- **Fotoionización a presión atmosférica (APPI):** permite ampliar la gama de compuestos analizables en MS ya que es capaz de ionizar compuestos tanto polares como no polares mediante distintos mecanismos de ionización, por lo que puede considerarse como una fuente de ionización universal. Además, presenta una baja susceptibilidad a la supresión iónica, un amplio rango lineal, y requiere menor temperatura que APCI para la desolvatación, permitiendo el análisis de compuestos térmicamente lábiles.

➤ Analizadores de masas:

- **Cuadrupolo (Q):** es probablemente el analizador de masas más utilizado, ya que posee propiedades analíticas muy elevadas, como elevada sensibilidad y reproducibilidad; y ofrece un rápido escaneo en amplios rangos de masas, sin embargo tiene una resolución limitada (que solo alcanza relaciones m/z nominales). Este tipo de analizador está compuesto por cuatro barras orientadas paralelamente e interconectadas entre sí en grupos de dos en dos. Su actividad consiste en aplicar voltajes de radiofrecuencia (RF) y corriente continua (DC) que permite que los iones se extraigan de la fuente de iones y sean acelerados (5-15 V) dentro del espacio central formado por el cuadrupolo a lo largo del eje longitudinal

hacia el detector. Solo los iones de una determinada relación m/z llegarán al detector para una proporción dada de tensiones siguiendo una trayectoria estable, mientras que aquellos iones que no se aproximen a esa relación m/z tendrán trayectorias inestables y chocarán con las varillas.

- **Tiempo de vuelo (TOF):** es el analizador de alta resolución más sencillo, el cual ofrece una elevada sensibilidad, exactitud de masa (5 ppm) y capacidad de escaneo rápido. Se basa en la medida del tiempo requerido por un ion para viajar desde la fuente de iones hasta el detector localizado a 1-2 m de la fuente. Todos los iones reciben la misma energía cinética durante la aceleración instantánea (3000 eV), pero debido a que tienen diferentes valores de m/z , se separan en grupos de acuerdo a su velocidad hasta llegar al detector. De esta manera, los iones chocan secuencialmente en el detector en forma de un incremento de m/z . Los iones de baja m/z llegan al detector antes que aquellos con m/z alta debido a que los iones con una relación m/z mayor tendrán una velocidad menor.

Alternativamente, el sistema híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) combina la estabilidad del cuadrupolo con la elevada resolución del analizador TOF, lo que le confiere una mayor exactitud de masa y permite llevar a cabo experimentos de fragmentación MS/MS (Weaver et al. 2007).

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

➤ Detectores:

- **Electromultiplicador (EM):** se basa en la energía cinética de los iones que impactan en la superficie del detector. Consta de una serie de dínodos de forma que cada dínodo se mantiene a un potencial más alto que el anterior. Cuando la superficie de un dínodo es alcanzado por un ión se produce la emisión de varios electrones, los cuales son acelerados hacia el siguiente dínodo de forma que cada electrón es capaz de provocar la emisión de varios electrones en dicho dínodo, y así sucesivamente, consiguiéndose ganancia de corriente de hasta 10^8 .
- **Fotomultiplicador (FM):** convierte el impacto de los iones en electrones y estos en fotones mediante un material fosforescente que finalmente mediante un fotomultiplicador da la señal a medir. Tienen una vida operativa más larga que los electromultiplicadores, tienen una respuesta muy rápida y una sensibilidad similar.

Por tanto, esta tecnología analítica, que puede proporcionar información clave sobre los analitos de interés, incluyendo su estructura, pureza y composición, es ampliamente usada en los análisis rutinarios en la industria y en el campo de investigación para el descubrimiento de fármacos, análisis medioambientales y bioanálisis (Feng et al. 2008). Sin embargo, cuando los análisis se llevan a cabo con un solo analizador de masas, el estudio de mezclas complejas requiere una etapa de purificación previa. De esta manera, los espectrómetros de masas se acoplan con algún dispositivo de separación, como la electroforesis capilar (CE), cromatógrafo de gases (GC) o cromatógrafo de líquidos (LC).

2.3.1. Espectrometría de masas para análisis multielemental

El análisis elemental es un proceso en el que una muestra de algún material (por ejemplo, suelo, agua residual o potable, fluidos biológicos, minerales o compuestos químicos) se analiza para determinar su composición elemental y, a veces, isotópica. El análisis elemental puede ser cualitativo (determinar qué elementos están presentes) o puede ser cuantitativo (determinar cuánto de cada uno está presente). La aparición de la técnica de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) en 1980 supuso una revolución dentro del análisis elemental inorgánico. Su desarrollo estuvo potenciado por la necesidad de combinar la capacidad multielemental y el amplio rango lineal de la espectroscopia de emisión óptica con fuente de acoplamiento inductivo (ICP-OES), con la posibilidad de alcanzar límites de detección excepcionalmente bajos con objeto de superar la espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS). La figura 16 muestra una visión general de las diferentes técnicas de análisis elemental.

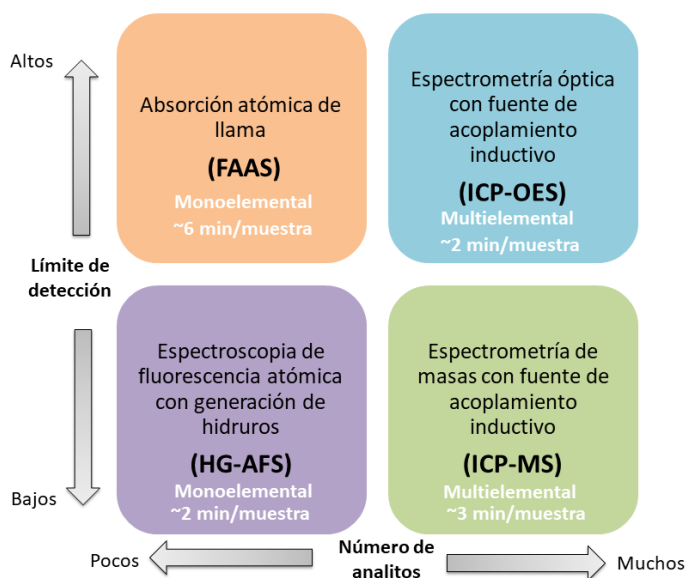


Figura 16. Características de las diferentes técnicas analíticas elementales. Concentración frente al número de analitos.

La detección mediante ICP-MS se basa en la ionización de los componentes de la muestra por efecto de un plasma de argón, donde los iones producidos serán separados en base a su relación masa/carga en un espectrómetro de masas y posteriormente cuantificados por un detector multiplicador de electrones (figura 21). Actualmente, se trata de la técnica analítica más utilizada en los análisis de trazas de metales, debido a las grandes ventajas que ofrece (Taylor 2001):

- Capacidad multielemental y multiisotópica (incluyendo no metales como S, Se y P). Debido a la capacidad que tiene el ICP-MS de medir simultáneamente múltiples elementos, posibilita la medida de las interacciones entre estos en los sistemas biológicos.
- Alta sensibilidad y rapidez en el análisis multielemental, lo cual posibilita la capacidad de cuantificar las concentraciones de un rango mínimo de 5 órdenes de magnitud, es decir desde unos limitados ppt a cantidades mayores de ppm. Permitiendo así, analizar un mayor número de elementos en menor tiempo.
- Robustez respecto a la matriz analizada. La señal obtenida es independiente de la estructura de la especie, de la matriz en la que se encuentre y del disolvente utilizado, siendo directamente proporcional a la masa del elemento.

Los componentes básicos de un espectrómetro de masas elemental se muestran en la figura 17:

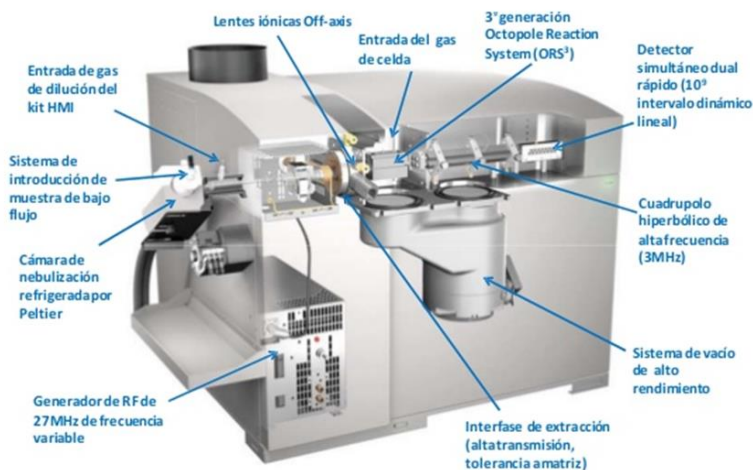


Figura 17. Representación esquemática de un equipo de ICP-ORS-MS.

- La muestra entra en estado líquida mediante una **bomba peristáltica** y se transforma en un aerosol en un sistema de nebulización neumática.
- La **cámara de nebulización** se encarga de seleccionar el tamaño de las gotas para evitar la inestabilidad del plasma, de tal manera que solo las gotas inferiores a 10µm entran en el plasma.
- Este aerosol es transportado por un flujo de gas (argón) al interior de un **plasma** de este mismo gas noble, que se genera en una antorcha de cuarzo mediante la aplicación de radiofrecuencias. Un plasma es “una masa de gas ionizado con alta energía, producido a partir de gases inertes, como el argón”. El plasma alcanza una alta temperatura, entre 6000-10000k, y de esta manera permite la desolvatación (remoción del solvente del aerosol), volatilización (descomposición de las partículas en moléculas gaseosas) y atomización (disociación de moléculas en átomos) de la muestra, y excitar los átomos y/o iones formados.
- Estos iones formados pasan a través de una **interfase**, formada por dos conos metálicos (de níquel o platino), que se encargan de minimizar la diferencia de presión, desde la presión atmosférica a la que se encuentra la fuente de iones a la baja presión del analizador de masas y el detector. A

través de los conos, el de muestreo y el skimmer, se inyecta el flujo del plasma en la zona de vacío por medio de un vacío diferencial, generado por medio de una bomba rotatoria.

- La muestra entra en la zona de baja presión, con dos tipos de lentes iónicas. Las **lentes iónicas** son placas electrostáticas situadas en la zona intermedia, que enfocan el haz de iones que proviene del skimmer, y se les aplica un voltaje que hará que los iones positivos del plasma sean atraídos y puedan ser manipulados en la trayectoria requerida. El sistema de lentes iónicas es responsable de separar los iones de las especies neutras y de los fotones gracias a los campos electrostáticos creados, y de redirigir y enfocar los iones, hacia la celda de reacción/colisión.
- La **celda de reacción/colisión** consiste en un octapolo que permite eliminar las posibles interferencias de la matriz de la muestra o espectrales que conlleva el uso de esta técnica.
- El haz de iones procedente de la celda es conducido el **analizador de masas**. Son cuatro barras metálicas que se encuentran paralelas y equidistantes, a las cuales se les aplica un potencial de corriente continua y un potencial de radiofrecuencia. La combinación de estos campos, hace que solo aquellos iones de una determinada relación m/z tengan una trayectoria estable y lleguen al detector. Por lo tanto, el cuadrupolo separa los iones en base a su relación m/z .
- Los iones son registrados por el **detector (multiplicador de electrones)**. Cuando los iones chocan con su superficie se originan electrones secundarios que se moverán, debido al cambio de potencial, hacia otras zonas donde originarán más electrones secundarios, los cuales provocarán una señal eléctrica, proporcional a la señal del elemento en la muestra.

Una de las principales desventajas del ICP-MS es que sufre ciertas interferencias en un número considerable de isótopos, las cuales podrán ser eliminadas mediante el

uso de una celda de colisión/reacción como ya se ha comentado anteriormente. Existen dos tipos fundamentales de interferencias, las cuales son:

- **Interferencias no espectrales:** provienen de la matriz de la muestra. Pueden afectar al análisis por ICP-MS originando pérdida/aumento de sensibilidad, resultados inexactos (malas recuperaciones), pobre precisión o deriva en los resultados. Estas interferencias pueden minimizarse, en muchos casos, mediante la dilución de la muestra y/o la adición de uno o varios patrones internos. El empleo de estos patrones internos es común en ICP-MS, dichos patrones internos deben tener un comportamiento similar al analito, es decir, una masa y un potencial de ionización similar y ayudan a compensar los efectos causados por la matriz.
- **Interferencias espectrales:** se deben al solapamiento de picos con el analito de interés. Estas interferencias se pueden dividir en diferentes subgrupos: solapamientos isobáricos, se produce cuando dos elementos tienen isótopos de igual masa, por ejemplo: ^{114}Sn con ^{114}Cd . Estas interferencias se pueden evitar de varias formas, como el uso de otros isótopos de nuestro analito de interés que estén libres de interferencias o el empleo de ecuaciones de corrección de interferencias. Iones poliatómicos: resultan de una combinación de dos o más especies atómicas con el Ar del plasma, como Ar, H y O, las cuales pueden combinarse entre sí o con elementos de la matriz de la muestra. Los picos poliatómicos principales se encuentran a m/z 56 (ArO^+), 42 (ArH_2^+) y 80 (Ar_2^+), este último provoca una interferencia poliatómica para una especie de gran interés en nuestros estudios, el ^{80}Se . Estas interferencias pueden evitarse mediante el uso de analizadores de mayor resolución o bien mediante el empleo de una celda de colisión/reacción capaz de destruir o minimizar el efecto de dichas interferencias. Por último, las interferencias por especies doblemente cargadas. En ICP-MS, la mayoría de los iones originados son productos de iones con carga única, aunque algunas especies tienen carga múltiple. La

formación de iones con carga doble en el plasma está controlada por la segunda energía de ionización del elemento y las condiciones de equilibrio del plasma. Aquellos elementos con una segunda energía de ionización más baja que la primera del Ar alcanzará un grado significativo de formación de carga 2+. El cuadrupolo separa las especies en función de su masa/carga, así pues un ion doblemente cargado tendrá $M/2$. Por ejemplo, la interferencia de $^{136}\text{Ba}^{2+}$ con $^{68}\text{Zn}^+$.

Estas interferencias pueden eliminarse con el uso de una celda de colisión/reacción como ya se mencionó anteriormente. Los procesos que se producen en la celda de colisión/reacción pueden seguir las siguientes estrategias:

- **Proceso de reacción**-gas reactivo (H_2 , CH_4 , NH_3 , He/H_2 , O_2) en la celda. El mecanismo de eliminación de las interferencias se basa en una reacción del gas reactivo con el ion. El ion poliatómico interferente es más reactivo que el analito con el gas reactivo elegido, permitiendo la eliminación del interferente. En otras ocasiones, menos frecuentes, el analito es más reactivo y se transforma en una nueva especie de masa diferente.
- **Proceso de colisión**-gas inerte (He) en la celda. La eliminación del interferente se produce mediante un mecanismo no reactivo, sin conversión de especies pudiendo ser aplicado a muchos iones poliatómicos sin crear nuevos iones interferentes.

Por tanto, el uso de ICP-MS en los análisis medioambientales constituye una herramienta muy valiosa ya que proporciona una gran sensibilidad, selectividad y precisión facilitando el análisis de metales a muy baja concentración en matrices biológicas complejas. Por estas razones, el ICP-MS ha remplazado prácticamente a otras técnicas como ICP-OES, XRF y el análisis instrumental por activación con neutrones (INAA), que se han usado anteriormente para la determinación multielemental de elementos trazas (Gao et al. 2007). En este sentido, la espectrometría de masas elemental ha sido ampliamente usada para la determinación

multielemental en distintos órganos de organismos de vida sometidos a estrés medioambiental, como el ratón *Mus spretus* (García-Sevillano et al. 2012; González-Fernandez et al. 2013) o el cangrejo *Procambarus clarkii* (Gago-Tinoco et al. 2014); también se ha llevado a cabo el análisis multielemental en organismos modelos, como el ratón de laboratorio *Mus Musculus* expuesto a diferentes metales tóxicos, como As (García-Sevillano et al. 2013), Hg (García-Sevillano et al. 2014c), incluso interacciones entre algunos elementos, como Hg/Se (García-Sevillano et al. 2015c).

Sin embargo, otro de los inconvenientes que presenta el ICP-MS es su incapacidad para caracterizar las estructuras de las metalobiomoléculas, por lo que es imprescindible el uso de una etapa previa de separación o el uso combinado de la espectrometría de masas elemental con la espectrometría de masas orgánicas (Chassaigne et al. 2000; Buchmann et al. 2003).

2.3.2. Espectrometría de masas para estudios proteómicos

Desafortunadamente, las mismas características que otorgan a las proteínas su papel fundamental como moléculas efectoras de la función celular (diversidad química y estructural y abundancia relativa) también dificultan su análisis experimental. Actualmente no existe un diagrama de flujo único para el análisis proteómico de una muestra, ya que las variables como complejidad, método de separación, concentración y estabilidad de las proteínas, además de la plataforma tecnológica disponible para su análisis, y muy especialmente el tipo de pregunta biológica que se pretende abordar, son los parámetros básicos que determinan la elección de una estrategia de estudio. Por lo tanto, no existe una metodología idónea para el estudio de proteomas en forma sistemática. En consecuencia, la investigación proteómica es el resultado de la aplicación de un conjunto de técnicas que permiten el estudio de proteínas.

La espectrometría de masas ha desempeñado un papel fundamental en los últimos años como técnica analítica para la identificación de proteínas. Esta técnica se basa

en la ionización de los componentes de la muestra en fase gaseosa, la separación de las especies iónicas resultantes de acuerdo a la relación de su masa con su carga eléctrica (m/z). Como se explicó anteriormente, los espectrómetros de masas poseen tres componentes básicos: un sistema de ionización, un analizador de masas y un detector de iones. Hasta fecha reciente, solamente podían ser sometidas a una ionización en fase gaseosa las sustancias de baja masa molecular y relativamente volátiles, mientras que las especies moleculares de mayores tamaños, tales como las proteínas, no se mantenían disueltas a nivel molecular en fase gaseosa. Sin embargo, el desarrollo de sistemas de ionización suaves, como ESI o MALDI, permitieron el análisis de macromoléculas, por lo que hoy en día la MS es la herramienta principal de la investigación en el campo de la proteómica (Xiao et al. 2017).

La identificación de proteínas a través de mapas peptídicos es la metodología más utilizada en los análisis proteómicos de los últimos años, principalmente debido a que la secuencia de una proteína es única y al ser cortada con una enzima origina un patrón peptídico específico (Kopczynski et al. 2017). Los valores exactos del conjunto de las masas moleculares de los péptidos es la representación única de una determinada proteína, ya que esta lista de masas moleculares está directamente relacionada con su estructura primaria. El espectro de masas evidencia la relación masa/carga (m/z) de los péptidos analizados y se convierte en una huella digital de la proteína analizada (mass fingerprinting). Esta lista de masas moleculares medidas por espectrometría de masas se somete a programas de análisis proteómico (Mascot, Uniprot, X! Tandem, SEQUEST y Andromeda) (Zhnag et al. 2019) para su comparación con las diferentes proteínas de las bases de datos. La comparación entre el listado de masas experimentales y teóricas se lleva a cabo mediante algoritmos específicos, que permitirá la identificación de la proteína. Dependiendo de la exactitud y resolución de cada instrumento, es suficiente identificar varios péptidos para la identificación de la proteína en las bases de datos. Esta metodología tiene el inconveniente que las proteínas sometidas para su identificación deben provenir de genomas secuenciados, debido a que esta se realiza por comparación de masas

moleculares donde uno o más cambios de aminoácidos en su secuencia pueden originar resultados negativos. Otra manera de identificar proteínas a través de espectrometría de masas es mediante el análisis de los espectros de fragmentación de uno o más péptidos, los cuales fueron generados por el corte de la proteína con una enzima. Con esta técnica se obtienen datos de secuencia, lo que implica una identificación inequívoca de la proteína en cuestión.

La espectrometría de masas permite llevar a cabo análisis cualitativos y/o cuantitativos del proteoma mediante el diseño experimental correspondiente. Los *análisis proteómicos cualitativo* se realizan mediante un análisis de espectro completo de proteínas, en el cual un SDS-PAGE gel o una mezcla de péptidos hidrolizados en solución se separan y detecta mediante LC-MS/MS. Las proteínas se identifican mediante la comparación de los espectros MS/MS con las bases de datos de proteínas (Zhang et al. 2018). Esta técnica presenta una elevada sensibilidad y permite la identificación de miles de proteínas incluso a pequeñas concentraciones. Sin embargo, la proteómica cualitativa se encarga solo de la identificación de las proteínas expresadas bajo ciertas condiciones, pero no refleja los cambios en los niveles de expresión de dichas proteínas bajo diferentes condiciones ambientales. Por lo tanto, se necesita la *proteómica cuantitativa* para investigar el nivel de proteínas diferenciales y las redes de interacción proteína-proteína de los organismos bajo determinadas condiciones ambientales. En este campo de estudio, el software MaxQuant ha adquirido gran importancia en los últimos años. MaxQuant es un software de proteómica cuantitativa diseñado para analizar conjuntos de datos de espectrometría de masas a gran escala. Se basa en un conjunto de algoritmos, que incluye la detección de picos y la puntuación de péptidos, realiza calibraciones en masa y búsquedas en bases de datos para la identificación de proteínas, cuantificando las proteínas identificadas (Cox y Mann 2008; Cox et al. 2009).

Por último, se pueden emplear herramientas bioinformáticas para el análisis de proteínas las cuales permiten llevar a cabo análisis de clusters, análisis de

clasificación funcional ontológica de genes, análisis de rutas biológicas y análisis de redes de interacción de proteínas (Zhnag et al. 2019).

2.3.3. Espectrometría de masas molecular para estudios metabolómicos

La metabolómica requiere el empleo de técnicas analíticas con elevada sensibilidad y capacidad de identificación de moléculas, siendo la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y MS los dos enfoques instrumentales más usados en esta disciplina ómica (Goldsmith et al. 2010). Como se ha discutido previamente, los perfiles metabólicos de un extracto biológico presentan de cientos a miles de señales relacionadas tanto con aportaciones genéticas como medioambientales. Además, debido a la amplia gama de productos químicos y metabolitos estructuralmente diferentes, no existe una técnica analítica capaz de caracterizar la totalidad del metaboloma a la vez, por lo que es necesario el uso complementario de diferentes plataformas analíticas para obtener una cobertura más amplia, especialmente en estudios metabolómicos no dirigidos.

RMN se caracteriza por ser una técnica con elevada reproducibilidad y análisis rápido de los compuestos. Además, no requiere una extensa preparación de las muestras y existen bases de datos disponibles que facilitan la identificación de los metabolitos (Beltran et al. 2012). También presenta un carácter no destructivo, consume una pequeña cantidad de muestra, y no requiere ninguna etapa previa de separación. Todas estas ventajas, han provocado que la RMN haya sido tradicionalmente la técnica más utilizada en metabolómica. Sin embargo, el principal inconveniente de la RMN es su escasa sensibilidad, lo que dificulta la detección de importantes metabolitos presentes a bajas concentraciones. Por esta razón, la MS ha conseguido una mayor importancia en este campo en los últimos años, debido a su mayor sensibilidad y especificidad, así como su posibilidad para aplicación a muestras complejas. Además, la MS es capaz de realizar tanto análisis cualitativo como

cuantitativo, proporcionando las huellas dactilares metabolómicas de las muestras de estudio, la clasificación e identificación de metabolitos alterados.

En MS, los extractos o muestras diluidas se pueden introducir directamente (infusión directa, DIMS) o utilizando un paso previo de separación, como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Issaq y Blonder 2009), cromatografía de gases (GC) (García y Barbas 2011), o electroforesis capilar (CE) (Soga 2007), con el objetivo de reducir la complejidad de los espectros de masas, evitar las interferencias isobáricas y la supresión iónica causadas por el efecto matriz en DIMS.

La GC acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), es uno de los enfoques más utilizados en metabolómica, ya que ofrece una elevada resolución cromatográfica y gran reproducibilidad entre diferentes instrumentos y laboratorios, lo que hace posible utilizar bases de datos (Viant y Sommer 2012). Esta técnica requiere un paso previo de derivatización química para muchos metabolitos que no son volátiles y no es válido para compuestos térmicamente inestables. La derivatización suele basarse en un primer paso de metoximación, generalmente con metoxiamina en piridina, seguido por un segundo paso de sililación con N-metil-N (trimetilsililo) -trifluoroacetamida (MSTFA) (Shi et al. 2014). Sin embargo, uno de los principales inconvenientes, es que los metabolitos de masa alta y polares no pueden ser analizados mediante esta técnica (Schauer et al. 2005). Finalmente, las fases estacionarias más usadas son 5% de grupo fenilo o 100% de polidimetilsiloxano (Naz et al. 2014).

Por otro lado, HPLC tiene menor resolución cromatografía, pero el número de metabolitos que se pueden analizar es mayor (Gika et al. 2007). El uso de UPLC presenta también importantes ventajas relacionadas con el mayor rendimiento de la muestra, la sensibilidad y la resolución. Por otro lado, la cromatografía fase inversa (RP) y la cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) son las principales fases estacionarias utilizadas en metabolómica. Aunque la RP presenta una alta sensibilidad y alta cobertura de metabolitos, no retiene metabolitos polares, por lo que

para este propósito se suele usar la HILIC (Viant y Sommer 2012). Sin embargo, no hay una columna capaz de retener todos los metabolitos.

Por otro lado, la CE es la más apropiada para analitos polares y cargados (Soga et al. 2003). Las principales ventajas de la CE respecto a LC y GC son una mayor resolución para los compuestos iónicos y sus isómeros, ya que en la CE los analitos se separan según la relación carga/masa, análisis más rápido, menor volumen de muestra y procedimientos de preparación de muestras simples. Además, comparando la CE con LC y GC, en esta técnica no se requiere interacción con la fase estacionaria. Sin embargo, la sensibilidad es menor, debido principalmente al bajo volumen de muestra requerido (Naz et al. 2014).

Considerando las ventajas e inconvenientes de las técnicas de separación acopladas a la espectrometría de masas, un número de estudios han propuesto el uso de infusión directa de la muestra a un espectrómetro de masas sin separación previa (DIMS) (García-Sevillano et al. 2013; González-Domínguez et al. 2014; Gago-Tinoco et al. 2014). Este enfoque hace que el análisis sea más sencillo y rápido. Sin embargo, DIMS tiene importantes inconvenientes asociados con la escasa diferenciación para los compuestos isobáricos y la dificultad de cuantificación debido a la supresión de iones (González-Domínguez et al. 2014). Los problemas de efecto de la matriz y la supresión de iones se atenúan mediante la dilución óptima de la muestra (González-Domínguez et al. 2014), y las interferencias isobáricas que afectan a la infusión directa son eliminadas con el uso de analizadores de masas de alta resolución, como los sistemas híbridos de triple cuadrupolo-tiempo de vuelo (QqQ-TOF) (Sun et al. 2007; García-Sevillano et al. 2013), espectrometría de masas de transformada de Fourier (FT/MS) (Junot et al. 2010), o más recientemente Orbitrap (Kamleh et al. 2008). La DIMS exhibe numerosas ventajas en metabolómica, como alta capacidad de detección y una cobertura más amplia del metabolito no dirigido que los acoplamientos cromatográficos y electroforéticos, ya que mediante esta metodología no se produce exclusión de compuestos asociados al paso previo de separación. Por esta razón, muchos estudios recomiendan el uso de la DIMS como

un método rápido para evaluar los efectos toxicológicos de los metales en los organismos (García-Sevillano et al. 2013; García-Sevillano et al. 2014c; García-Sevillano et al. 2015a), ya que cada muestra puede ser analizada en unos pocos minutos, mientras que el acoplamiento LC-MS requiere tiempos de análisis más largos.

Sin embargo, debido a la complejidad del metaboloma en muestras biológicas, los análisis metabolómicos combinando varias plataformas analíticas son cada vez más frecuentes, con el fin de obtener mayor información sobre los cambios, la sobreexpresión y la inhibición de los metabolitos. Por lo general, estos diseños instrumentales combinan acoplamientos para metabolitos polares y no polares. En este sentido, el uso combinado de DIMS para metabolitos más polares y GCMS para metabolitos de baja polaridad, proporciona información muy valiosa sobre un gran número de metabolitos primarios claves como, aminoácidos, ácidos orgánicos, o carbohidratos, implicados en importantes rutas metabólicas del organismo (glucólisis, ciclo de Krebs, ácidos grasos libres, y otros) y hace que esta combinación sea una alternativa muy interesante para el estudio del metaboloma (García-Sevillano et al. 2014a).

En los experimentos metabolómicos, especialmente en estudios no dirigidos, los espectros o cromatogramas obtenidos presentan una elevada complejidad, por lo que tras el análisis de las muestras es necesario un preprocesamiento de datos exhaustivo que convierte los datos en bruto en una matriz bidimensional fácil de ser utilizada en los siguientes pasos. Para ello, existen diversas herramientas de software libre (XCMS, MZmine, Rcomandante) o específicas del espectrómetro de masas (MassHunter, Agilent Technologies; MarkerLynx, Waters; MarkerView, Sciex). Según el procedimiento propuesto por Katajamaa y colaboradores, el preprocesamiento de datos consiste en una serie de etapas, entre las que se incluyen: filtrado, eliminación de ruido, o señal de fondo, detección de picos, alineación, y normalización (Katajamaa y Oresic 2007).

Después del preprocesamiento, los datos deben someterse a un análisis estadístico para la comparación de los grupos de estudio (por ejemplo, control frente a bioindicadores expuestos un determinado metal) (Nagato et al. 2013). La interpretación de los datos analíticos requiere herramientas estadísticas avanzadas debido al gran número de muestras y variables involucradas en estos experimentos. Con este objetivo, se suele aplicar un análisis multivariante para reducir las complejas matrices obtenidas, aunque los resultados deben ser validados posteriormente por otras técnicas univariantes convencionales. Estos modelos permiten identificar valores atípicos y visualizar grupos y tendencias entre las diferentes muestras de estudio, facilitando la interpretación de los resultados. Entre los métodos multivariantes, destacan el análisis de componentes principales (PCA), que se trata de un modelo estadístico construido sin un conocimiento previo de las relaciones entre muestras y grupos; el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) o el PLS ortogonal (OPLS), los cuáles son métodos supervisados ampliamente utilizados para el tratamiento de datos metabolómicos (Gromski et al. 2015). Estos resultados deben ser validados posteriormente por técnicas analíticas univariantes, que pueden ser paramétricas (t-test Student o análisis de varianza (ANOVA) o no paramétricas (por ejemplo, Mann-Whitney test).

Finalmente, una vez que se conocen las variables (por ejemplo, m/z de los espectros de masas) responsables de la clasificación de las muestras entre los distintos grupos, el siguiente paso es la identificación de los metabolitos. Cuando se utiliza la espectrometría de masas, los metabolitos se pueden identificar fácilmente por experimentos MS/MS con la ayuda de las bases de datos de espectros de masas (por ejemplo, NIST, Instituto Nacional de Estándares y Tecnología; base de datos del metabolismo humano: <http://www.hmdb.ca/>; base de datos METLIN: <http://metlin.scripps.edu/>). Sin embargo, en acoplamientos LC-MS es más complejo, debido a la variabilidad de las fuentes de ionización.

Después de la identificación de metabolitos (biomarcadores) es necesario la interpretación de los resultados para encontrar una relación entre la exposición al

metal y el deterioro de las vías metabólicas. La interpretación de los cambios de metabolitos no es fácil, ya que el metabolismo está altamente interconectado con otros metabolitos y un cambio en un determinado metabolito puede desencadenar cambios en muchas rutas metabólicas. Por tanto, conocer la conexión entre los diferentes tipos de metabolitos es esencial, lo que requiere el empleo de diversas disciplinas, como la química, biología, medicina, incluso la estadística. Con la información resultante podemos hipotetizar sobre las posibles perturbaciones observadas entre los grupos de muestras, lo que puede conducir a suposiciones o trabajos futuros dirigidos hacia la identificación y cuantificación de metabolitos de especial interés en estas vías metabólicas.

2.3.4. Técnicas de separación cromatográfica para estudios metalómicos y de especiación química

Los procedimientos analíticos metalómicos y de especiación química deben producir una señal específica para cada metalobiomolécula que contenga uno o varios metales, permitiendo así su detección, identificación y cuantificación. Los acoplamientos cromatográficos permiten la identificación de especies mediante comparación de los tiempos de retención de las especies a identificar y de los patrones disponibles. Sin embargo, la coelución de especies y la falta de patrones comerciales, son los principales problemas asociados a una correcta identificación y confirmación de la identidad de las especies.

En este campo, podemos distinguir dos tipos enfoques: (a) enfoques analíticos dirigidos, centrados en especies químicas organometálicas de baja masa molecular muy conocidas de origen antropogénico, que pueden sufrir la transformación de los organismos vivos después de la ingesta para reducir su toxicidad: *métodos de especiación*; (b) enfoques analíticos no dirigidos para las biomoléculas metálicas presentes en sistemas biológicos, normalmente con estructura, tamaño y composición desconocidos: *metalómica*. Por tanto, es necesario definir claramente el problema a estudiar con el objetivo de diseñar los métodos analíticos adecuados.

En estudios de especiación química se utilizan acoplamientos instrumentales bidimensionales que combinan el potencial discriminador de especies de las técnicas cromatográficas, como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la electroforesis capilar (CE) o la cromatografía de gases (GC) con cualquier detector atómico sensible (principalmente, espectrometría de fluorescencia atómica, AFS y espectrometría de masas de acoplamiento inductivo, ICP-MS) para detectar los metales presentes en la molécula. En los estudios de especiación, el analista tiene patrones comerciales disponibles o bien los puede sintetizar, lo que permite la validación de los métodos aplicados usando materiales de referencia certificados (Bettmer et al. 2009).

Sin embargo, hay que considerar que en los estudios metalómicos, las biomoléculas de metal estudiadas son “a priori” desconocidas, por tanto en metalómica no existen estándares ni materiales de referencia, por lo que la naturaleza de las biomoléculas metálicas se debe caracterizar por espectrometría de masas molecular, lo que hace necesaria una tercera dimensión instrumental: (a) una primera unidad de separación (HPLC, GC o CE) para la separación de las biomoléculas objetivo de la matriz; (b) un detector atómico sensible para rastrear las biomoléculas que contienen metales, (normalmente ICP-MS), y (c) una unidad para la caracterización estructural de las moléculas (generalmente, un espectrómetro de masas en tándem de alta resolución) y poder identificar las moléculas desconocidas (Gómez-Ariza et al. 2004; Bettmer et al. 2009; García-Sevillano et al. 2012). Además, el reciente desarrollo de los espectrómetros de masas de alta resolución tales como los sistemas híbridos cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF), cuadrupolo-trampa de iones (Q-IT), triple cuadrupolo-tiempo de vuelo (QqQ-TOF) o el Orbitrap (OT) permiten una identificación inequívoca de biomoléculas (Mounicou et al. 2009; Bettmer et al. 2009).

La figura 18 muestra las principales estrategias seguidas en el desarrollo y aplicación de técnicas metalómicas y especiación química.

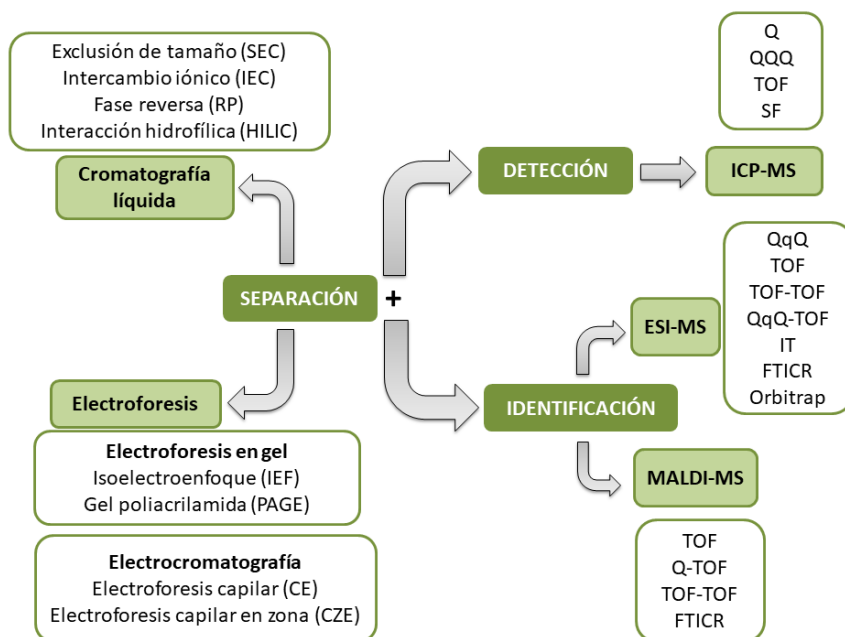


Figura 18. Representación esquemática de las técnicas híbridas utilizadas para el estudio de metalobiomoléculas en los fluidos biológicos.

Como se puede ver en la figura 18, la separación de especies requiere el empleo de procedimientos multidimensionales, ya que ninguna técnica individual permite resolver el conjunto de todas las proteínas. Estas plataformas multidimensionales emplean dos (o más) métodos de separación ortogonales con mecanismos de retención complementarios (Issaq 2001):

- La **electroforesis en gel (GE)** se puede llevar a cabo en una o dos dimensiones. Esta técnica se caracteriza por poseer mejor resolución que las técnicas cromatográficas. La electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (PAGE) es la técnica más ampliamente utilizada para llevar a cabo la separación de proteomas complejos, habitualmente en su modalidad bidimensional mediante el acoplamiento de isoelectroenfoque (IEF, *isoelectric focusing*) y PAGE. En este caso, la estructura secundaria de proteínas se desnaturaliza mediante el empleo de SDS. Sin embargo, su uso

se ve dificultado en metalómica ya que los complejos metálicos pueden disociar fácilmente durante el proceso de migración y tinción de geles, por lo que deben tomarse grandes precauciones para realizar la separación en condiciones no desnaturalizantes, y evitar la presencia de impurezas metálicas en los geles y los reactivos de tinción. Para evitar este problema, pueden aplicarse condiciones no desnaturalizantes (BN-PAGE).

- La **electroforesis capilar (CE)** también ha demostrado una gran utilidad gracias a su elevada resolución y el desarrollo de múltiples modos de electromigración complementarios (CZE, MEKC, IEF), aunque su aplicabilidad se ve limitada a péptidos y proteínas de baja masa molecular.

Sin embargo, las metodologías analíticas basadas en el uso de la cromatografía líquida son las más ampliamente utilizadas en este campo, gracias a su amplio rango de aplicabilidad debido a la disponibilidad de distintas fases estacionarias. Para este propósito, se han utilizado varios modos de separación con objeto de discriminar las especies, llevándose a cabo la separación en escala preparativa, analítica, capilar o nano-escala, y por lo general con dos o tres sistemas cromatográficos ortogonales que se combinan para aumentar la resolución en la separación de las metalobiomoléculas. Los mecanismos de separación más utilizados en HPLC son:

- **Cromatografía de exclusión molecular (SEC):** El acoplamiento SEC-ICP-MS permite realizar un rápido “*screening*” cualitativo de metalobiomoléculas en muestras biológicas de acuerdo a su masa molecular (Szpunar 2000; Szpunar 2005). Se trata de un acoplamiento muy sencillo y permite el fraccionamiento de metalobiomoléculas en función de su tamaño, seguido de la detección multielemental, lo que permite monitorizar tanto diversos metales como otros heteroátomos que puedan estar presentes, como P (en el caso de fosfoproteínas, o nucleótidos) o S en las proteínas. Debido a su baja resolución, SEC tan solo puede considerarse una técnica preparativa en separaciones multidimensionales (Chan y Caruso 2012; Cubadda et al. 2012). Por lo tanto, después de la separación SEC se deben aplicar otras

técnicas cromatográficas que utilizan mecanismos de separación diferentes, para poder llevar a cabo la purificación de las metalobiomoléculas, pudiéndose asociar de manera inequívoca un elemento traza en particular con una biomolécula en una fracción dada.

- **Cromatografía de intercambio aniónico (AEC):** Permite la separación de las especies aniónicas presentando mayor poder de resolución que la SEC y capacidades preconcentradoras.
- **Cromatografía de fase reversa (RPC):** Permite la separación de moléculas neutras, aniónicas y catiónicas mediante la adición de agentes formadores de pares iónicos a la fase móvil (Nurmi et al. 2005). La cromatografía de fase reversa, requiere en ocasiones el empleo de un gradiente de polaridad para llevar a cabo la elución cromatográfica, pudiéndose alcanzar altas concentraciones de disolventes orgánicos, llegando hasta el 100% de metanol o acetonitrilo. Por tanto, la cromatografía RP puede producir desnaturalización de metaloproteínas no resistentes a disolventes orgánicos que pueden dar lugar a su precipitación y problemas adicionales cuando se acopla a ICP-MS. Además, el uso de altas concentraciones de disolventes orgánicos, puede afectar negativamente a la estabilidad del plasma y el gradiente de elución puede inducir cambios la sensibilidad de ICP-MS, por lo que la cuantificación se hace más compleja.
- **Cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC):** Presenta particular interés para el estudio de metalometabolitos por su carácter polar y baja hidrofobicidad. Las fases estacionarias están constituidas por grupos polares o hidrofílicos y las fases móviles utilizadas incluyen medios acuosos y orgánicos.

Las condiciones óptimas de extracción de muestra y posterior separación cromatográfica o electroforética dependerán de los objetivos específicos de cada experimento metalómico. Sin embargo, un factor clave a tener en cuenta en cualquier diseño experimental metalómico es asegurar la estabilidad termodinámica de las

metaloespecies, debido a la labilidad que suelen mostrar los enlaces metal-biomolécula (excepto en especies unidas covalentemente).

Para la determinación de especies de As, la cromatografía de intercambio iónico (IE) ha sido el modo cromatográfico más empleado en HPLC, debido a la naturaleza iónica de las principales especies de este elemento, especialmente las más tóxicas, y a su menor sensibilidad a las interferencias por efecto de la matriz, al utilizarse fases móviles con elevada capacidad tamponadora. Las especies de As presentan características iónicas muy variables y dependientes del pH, de forma que pueden ser catiónicas, aniónicas o neutras (Leermakers et al. 2006). A pH neutro, las especies de As(V), metilarsónico (MMA) y dimetilarsínico (DMA) se encuentran como aniones; arsenocolina (AsC), óxido de trimetilarsina (TMAO) e ión tetrametilarsonio (TETRA) como cationes; AsB como zwitterión; y As(III) como especie neutra (Sharma y Sohn 2009). Como resultado, las especies As(III), As(V), DMA y MMA suelen separarse mediante AEC, junto con los arsenoazúcares (Raber et al. 2000), aunque es necesario tener en cuenta que el As(III) suele eluir en las proximidades del tiempo muerto, por lo que puede solapar con especies neutras o catiónicas no retenidas (Gómez-Ariza et al. 2001). Por otro lado, las especies AsB, AsC, TMAO y TETRA se suelen separar mediante intercambio catiónico. La AEC se ha aplicado ampliamente para la determinación de As en diferentes tejidos de ratón tras la exposición de As (García-Sevillano et al. 2013).

2.4. Referencias

Abraham JK, Chipman KJ, Katsiadaki I, Diab AM, Lyons BP, Mackenzie C, Taggart JB, Bartie KL, Turan N, Leaver MJ, Falciani F, Stentiford GD, Herbert JM, George SG, Wu H, Williams TD, Viant MR, Hrydziuszko O (2011) Towards a System Level Understanding of Non-Model Organisms Sampled from the Environment: A Network Biology Approach. *PLoS Comput Biol* 7:e1002126 . doi: 10.1371/journal.pcbi.1002126

Abril N, Chicano-Gálvez E, Michán C, Pueyo C, López-Barea J (2015) iTRAQ analysis of hepatic proteins in free-living *Mus spretus* mice to assess the contamination status of areas surrounding Doñana National Park (SW Spain). *Sci Total Environ* 523:16–27 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.116

Aitio A, Anderson D, Blain P, Bond J, Buratti M, Calder I, Chahoud I, Fowle JR, Gerhardsson L, Koeter HBWM, Nishikawa A, Thompson CL, Zenick H (1993) Biomarkers and risk assessment: Concepts and principles. *Environ Heal Criteria* 3–82

Alp O, Zhang Y, Merino EJ, Caruso JA (2011) Selenium effects on arsenic cytotoxicity and protein phosphorylation in human kidney cells using chip-based nanoLC-MS/MS. *Metallomics* 3:482–90 . doi: 10.1039/c0mt00110d

Anderson NL, Anderson NG (1998) Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19:1853–1861 . doi: 10.1002/elps.1150191103

Barge LM, Nitschke W, Tsapin AI, Russell MJ, Ponce A, Schoepp-Cothenet B (2011) A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus. *Science* (80-) 332:1149–1149 . doi: 10.1126/science.1201438

Bayne B, Brown D, Burns K, Dixon D, Ivanovici A, Livingstone D, Lowe D, Moore M, Stebbing A, Widdows J (1985) *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*. Praeger

Bayne BL, Livingstone DR, Moore MN, Widdows J (1976) A cytochemical and a biochemical index of stress in *Mytilus edulis* L. *Mar Pollut Bull* 7:221–224 . doi:

10.1016/0025-326X(76)90265-4

Bebianno MJ, Serafim MA (1998) Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *Sci Total Environ* 214:123–131 . doi: 10.1016/S0048-9697(98)00059-X

Beecher C (2003) The human metabolome. In: Harrigan G, Goodacre R (eds) *Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis*. Springer, New York, USA

Beltran A, Suarez M, Rodríguez MA, Vinaixa M, Samino S, Arola L, Correig X, Yanes O (2012) Assessment of Compatibility between Extraction Methods for NMR- and LC/MS-Based Metabolomics. *Anal Chem* 84:5838–5844 . doi: 10.1021/ac3005567

Bernal MP, Clemente R, Vazquez S, Walker DJ (2007) Aplicación de la Fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar. *Ecosistemas* 16:67–76

Bettmer J, Montes Bayón M, Encinar JR, Fernández Sánchez ML, Fernández de la Campa M del R, Sanz Medel A (2009) The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. *J Proteomics* 72:989–1005

Blackstock WP, Weir MP (1999) Proteomics: Quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 17:121–127 . doi: 10.1016/S0167-7799(98)01245-1

Boernsen KO, Gatzek S, Imbert G (2005) Controlled protein precipitation in combination with chip-based nanospray infusion mass spectrometry. An approach for metabolomics profiling of plasma. *Anal Chem* 77:7255–64

Bonilla-Valverde D, Ruiz-Laguna J, Muñoz A, Ballesteros J, Lorenzo F, Gómez-Ariza JL, López-Barea J (2004) Evolution of biological effects of Aznalcóllar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers. *Toxicology* 197:123–38 . doi: 10.1016/j.tox.2003.12.010

Bouhifd M, Hartung T, Hogberg HT, Kleensang A, Zhao L (2013) Review:

toxicometabolomics. *J Appl Toxicol* 33:1365–83 . doi: 10.1002/jat.2874

Bozo L, Fernández M, López M, Reyes R, Suárez P (2007) Biomarcadores de contaminación química en comunidades microbianas. *Interciencia* 32:8–13

Braman R, Foreback C (1973) Methylated forms of arsenic in the environment. *Science* (80-) 182:1247–1249

Bremner I, Beattie JH (2005) Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. *Proc Nutr Soc* 54:489–499 . doi: 10.1079/pns19950017

Brouquisse R, Deborde C, Moing A, Chaïbi W, Maucourt M, Cabasson C, Boulila Zoghliami L, Djebali W, Hédiji H, Bertrand A, Gallusci P, Baldet P (2010) Effects of long-term cadmium exposure on growth and metabolomic profile of tomato plants. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1965–1974 . doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.08.014

Buchmann W, Tortajada J, Ouerdane L, Lobinski R, Szpunar J, Ruiz Encinar J (2003) Identification of Water-Soluble Selenium-Containing Proteins in Selenized Yeast by Size-Exclusion-Reversed-Phase HPLC/ICPMS Followed by MALDI-TOF and Electrospray Q-TOF Mass Spectrometry. *Anal Chem* 75:3765–3774 . doi: 10.1021/ac034103m

Bundy JG, Davey MP, Viant MR (2008a) Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 5:3–21 . doi: 10.1007/s11306-008-0152-0

Bundy JG, Sidhu JK, Rana F, Spurgeon DJ, Svendsen C, Wren JF, Stürzenbaum SR, Morgan AJ, Kille P (2008b) “Systems toxicology” approach identifies coordinated metabolic responses to copper in a terrestrial non-model invertebrate, the earthworm *Lumbricus rubellus*. *BMC Biol* 6:1–21 . doi: 10.1186/1741-7007-6-25

Calamari D (2002) Assessment of persistent and bioaccumulating chemicals in the aquatic environment. *Toxicology* 181–182:183–186 . doi: 10.1016/S0300-483X(02)00278-0

Chambers J, Scott Boone J, Carr RL, Chambers H, Straus D (2002) Biomarkers as Predictors in Health and Ecological Risk Assessment. *Hum Ecol Risk Assess An Int J*

8:165–176

Chan Q, Caruso JA (2012) A metallomics approach discovers selenium-containing proteins in selenium-enriched soybean. *Anal Bioanal Chem* 403:1311–1321 . doi: 10.1007/s00216-012-5948-0

Chaperon S, Sauvé S (2008) Toxicity interactions of cadmium, copper, and lead on soil urease and dehydrogenase activity in relation to chemical speciation. *Ecotoxicol Environ Saf* 70:1–9 . doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.10.026

Chassaigne H, Vacchina V, Łobiński R (2000) Elemental speciation analysis in biochemistry by electrospray mass spectrometry. *TrAC - Trends Anal Chem* 19:300–313 . doi: 10.1016/S0165-9936(99)00217-4

Chen Y, Hall M, Graziano JH, Slavkovich V, van Geen A, Parvez F, Ahsan H (2007) A prospective study of blood selenium levels and the risk of arsenic-related premalignant skin lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:207–13 . doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0581

Choi AL, Budtz-Jørgensen E, Jørgensen PJ, Steuerwald U, Debes F, Weihe P, Grandjean P (2008) Selenium as a potential protective factor against mercury developmental neurotoxicity. *Environ Res* 107:45–52 . doi: 10.1016/j.envres.2007.07.006

Compta Y, Parkkinen L, O'Sullivan SS, Vandrovцова J, Holton JL, Collins C, Lashley T, Kallis C, Williams DR, De Silva R, Lees AJ, Revesz T (2011) Lewy- and Alzheimer-type pathologies in Parkinson's disease dementia: Which is more important? *Brain* 134:1493–1505 . doi: 10.1093/brain/awr031

Contreras-Acuña M, García-Barrera T, García-Sevillano MA, Gómez-Ariza JL (2013) Speciation of arsenic in marine food (*Anemonia sulcata*) by liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and organic mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1282: . doi: 10.1016/j.chroma.2013.01.068

Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized

p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26:1367–1372 . doi: 10.1038/nbt.1511

Cox J, Matic I, Hilger M, Nagaraj N, Selbach M, Olsen J V., Mann M (2009) A practical guide to the maxquant computational platform for silac-based quantitative proteomics. *Nat Protoc* 4:698–705 . doi: 10.1038/nprot.2009.36

Cristaldi M, D'Arcangelo E, Ieradi LA, Mascanzoni D, Mattei T, Van Axel Castelli I (1990) ¹³⁷Cs Determination and mutagenicity tests in wild *Mus musculus domesticus* before and after the Chernobyl accident. *Environ Pollut* 64:1–9 . doi: 10.1016/0269-7491(90)90091-P

Cristaldi M, Ieradi LA, Mascanzoni D, Mattei T (1991) Environmental Impact of the Chernobyl Accident: Mutagenesis in Bank Voles from Sweden. *Int J Radiat Biol* 59:31–40 . doi: 10.1080/09553009114550031

Cubadda F, Szpunar J, Ouerdane L, Aureli F, Prakash NT, Bierla K (2012) Identification of selenosugars and other low-molecular weight selenium metabolites in high-selenium cereal crops. *Metallomics* 4:968 . doi: 10.1039/c2mt20085f

Depledge MH (1994) The Rational Basis for the Use of Biomarkers as Ecotoxicological tools. In: Fossi MC, Leonzio C (eds) *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Lewis publisher, Boca Ratón, pp 271–295

Donard OFX, Ritsema R (2008) Hyphenated Techniques Applied To The Speciation Of Organometallic Compounds In The Environment. *Tech Instrum Anal Chem* 13:549–606 . doi: 10.1016/s0167-9244(08)70136-7

Dowling V, Hoarau PC, Romeo M, O'Halloran J, Van Pelt F, O'Brien N, Sheehan D (2006) Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussatus* following p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure: A proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. *Aquat Toxicol* 77:11–18 . doi: 10.1016/j.aquatox.2005.10.011

Dudka I, Kossowska B, Senhadri H, Latajka R, Hajek J, Andrzejak R, Antonowicz-Juchniewicz J, Gancarz R (2014) Metabonomic analysis of serum of workers

occupationally exposed to arsenic, cadmium and lead for biomarker research: A preliminary study. *Environ Int* 68:71–81 . doi: 10.1016/j.envint.2014.03.015

Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL (2011) Systems level studies of mammalian metabolomes: The roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev* 40:387–426 . doi: 10.1039/b906712b

Dunn WB, Ellis DI (2005) Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC - Trends Anal Chem* 24: . doi: 10.1016/j.trac.2004.11.021

El-Maraghy SA, Gad MZ, Fahim AT, Hamdy MA (2001) Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues. *J Biochem Mol Toxicol* 15:207–14 . doi: 10.1002/jbt.18

Elder JF, Collins JJ (1991) Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems. *Rev Environ Contam Toxicol* 122:37–79

EPA (Environmental Protection Agency) (1982) *Water Quality Assessment: A Screening Procedure for Toxic and Conventional Pollutants*

Fang L, Wei J, Yang J, Liu Z, Li J (2006) Study of antagonism of zinc against arsenic-induced abnormal blood lipids in rats. *Chinese J Endem* 25:9–11

Fang SC (1977) Interaction of selenium and mercury in the rat. *Chem Biol Interact* 17:25–40 . doi: 10.1016/0009-2797(77)90069-2

Farina M, Rocha JBT, Aschner M (2011) Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sci* 89:555–63 . doi: 10.1016/j.lfs.2011.05.019

Fattorini D, Notti A, Regoli F (2006) Characterization of arsenic content in marine organisms from temperate, tropical, and polar environments. *Chem Ecol* 22:405–414

Fattorini D, Regoli F (2004) Arsenic speciation in tissues of the mediterranean polychaete *sabella spallanzanii*. *Environ Toxicol Chem* 23:1881 . doi: 10.1897/03-562

Feng X, Liu X, Luo Q, Liu B (2008) Mass spectrometry in systems biology: an overview. *Mass Spectrom Rev* 27:635–660

Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, McKenney K, Sutton G, FitzHugh W, Fields C, Gocayne JD, Scott J, Shirley R, Liu LI, Glodek A, Kelley JM, Weidman JF, Phillips CA, Spriggs T, Hedblom E, Cotton MD, Utterback TR, Hanna MC, Nguyen DT, Saudek DM, Brandon RC, Fine LD, Fritchman JL, Fuhrmann JL, Geoghagen NSM, Gnehm CL, McDonald LA, Small K V., Fraser CM, Smith HO, Venter JC (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* (80-) 269:496–512

Förstner U, Wittmann GTW (1981) *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer Science

Francesconi KA (2010) Arsenic species in seafood: Origin and human health implications. *Pure Appl Chem* 82:373–381 . doi: 10.1351/PAC-CON-09-07-01

Gago-Tinoco A, González-Domínguez R, García-Barrera T, Blasco-Moreno J, Bebianno MJ, Gómez-Ariza J-L (2014) Metabolic signatures associated with environmental pollution by metals in Doñana National Park using *P. clarkii* as bioindicator. *Environ Sci Pollut Res Int* 21:13315–23 . doi: 10.1007/s11356-014-2741-y

Gailer J, Buttigieg GA, Denton MB (2003) Simultaneous arsenic- and selenium-specific detection of the dimethyldiselenoarsinate anion by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Appl Organomet Chem* 17:570–574 . doi: 10.1002/aoc.477

Galloway TS, Sanger RC, Smith KL, Fillmann G, Readman JW, Ford TE, Depledge MH (2002) Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environ Sci Technol* 36:2219–2226 . doi: 10.1021/es010300w

Gao Y, Chen C, Chai Z (2007) Advanced nuclear analytical techniques for metalloproteomics. *J Anal At Spectrom* 22:856–866

Gao Y, Lu Y, Huang S, Gao L, Liang X, Wu Y, Wang J, Huang Q, Tang L, Wang G, Yang F, Hu S, Chen Z, Wang P, Jiang Q, Huang R, Xu Y, Yang X, Ong CN (2014) Identifying early urinary metabolic changes with long-term environmental exposure to cadmium by mass-spectrometry-based metabolomics. *Environ Sci Technol* 48:6409–6418 . doi: 10.1021/es500750w

Garay Sevilla ME, Wrobel K, Flores CR, Wrobel K, Puga MP (2011) Trace elements status in diabetes mellitus type 2: Possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. *Diabetes Res Clin Pract* 91:333–341 . doi: 10.1016/j.diabres.2010.12.014

García-Barrera T, Gómez-Ariza JL, González-Fernández M, Moreno F, García-Sevillano MA, Gómez-Jacinto V (2012) Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species. *Anal Bioanal Chem* 403:2237–53 . doi: 10.1007/s00216-012-5776-2

García-Sevillano MA, Abril N, Fernández-Cisnal R, García-Barrera T, Pueyo C, López-Barea J, Gómez-Ariza JL (2015a) Functional genomics and metabolomics reveal the toxicological effects of cadmium in *Mus musculus* mice. *Metabolomics*. doi: 10.1007/s11306-015-0801-z

García-Sevillano MÁ, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL (2015b) Environmental metabolomics: Biological markers for metal toxicity. *Electrophoresis* 36: . doi: 10.1002/elps.201500052

García-Sevillano MA, Rodríguez-Moro G, García-Barrera T, Navarro F, Gómez-Ariza JL (2015c) Biological interactions between mercury and selenium in distribution and detoxification processes in mice under controlled exposure. Effects on selenoprotein. *Chem Biol Interact* 229:82–90 . doi: 10.1016/j.cbi.2015.02.001

García-Sevillano MA, Contreras-Acuña M, García-Barrera T, Navarro F, Gómez-Ariza JL (2014a) Metabolomic study in plasma, liver and kidney of mice exposed to inorganic arsenic based on mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 406:1455–1469 . doi:

10.1007/s00216-013-7564-z

García-Sevillano MÁ, García-Barrera T, Abril N, Pueyo C, López-Barea J, Gómez-Ariza JL (2014b) Omics technologies and their applications to evaluate metal toxicity in mice *M. spretus* as a bioindicator. *J Proteomics* 104:4–23 . doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.032

García-Sevillano MA, García-Barrera T, Navarro F, Gailer J, Gómez-Ariza JL (2014c) Use of elemental and molecular-mass spectrometry to assess the toxicological effects of inorganic mercury in the mouse *Mus musculus*. *Anal Bioanal Chem* 406:5853–65 . doi: 10.1007/s00216-014-8010-6

García-Sevillano MT, García-Barrera T, Navarro-Roldán F, Montero-Lobato Z, Gómez-Ariza JL (2014d) A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under arsenic/cadmium exposure. *J Proteomics* 104: . doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.011

García-Sevillano MA, García-Barrera T, Navarro F, Gómez-Ariza JL (2013) Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As₂O₃ based on integrated -omics approaches. *Metallomics* 5:1644–55 . doi: 10.1039/c3mt00186e

García-Sevillano MA, González-Fernández M, Jara-Biedma R, García-Barrera T, López-Barea J, Pueyo C, Gómez-Ariza JL (2012) Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 404:1967–81 . doi: 10.1007/s00216-012-6274-2

Garcia A, Barbas C (2011) Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. *Methods Mol Biol* 708:191–204 . doi: 10.1007/978-1-61737-985-7_11

Gika HG, Theodoridis GA, Wingate JE, Wilson ID (2007) Within-day reproducibility of an HPLC-MS-based method for metabonomic analysis: application to human urine. *J Proteome Res* 6:3291–303 . doi: 10.1021/pr070183p

Glaser V, Nazari EM, Müller YMR, Feksa L, Wannmacher CMD, Rocha JBT, de Bem AF,

Farina M, Latini A (2010) Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci* 28:631–7 . doi: 10.1016/j.ijdevneu.2010.07.225

Goldsmith P, Fenton H, Morris-Stiff G, Ahmad N, Fisher J, Prasad KR (2010) Metabonomics: a useful tool for the future surgeon. *J Surg Res* 160:122–32 . doi: 10.1016/j.jss.2009.03.003

Gómez-Ariza AL, Morales E, Giráldez I, Sánchez-Rodas D, Velasco A (2001) Sample treatment in chromatography-based speciation of organometallic pollutants. *J Chromatogr A* 938:211–224 . doi: 10.1016/S0021-9673(01)01103-7

Gómez-Ariza JL, García-Barrera T, Lorenzo F, Bernal V, Villegas MJ, Oliveira V (2004) Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. *Anal Chim Acta* 524:15–22

Gómez-Ariza JL, Gonzalez-Fernandez M, Garcia-Barrera T, Lopez-Barea J, Pueyo C (2008) Integration metallomics, proteomics and transcriptomics in environmental issues. In: *Chemicke Listy*. pp S303-308

Gómez-Ariza JL, Jahromi EZ, González-Fernández M, García-Barrera T, Gailer J (2011) Liquid chromatography-inductively coupled plasma-based metallomic approaches to probe health-relevant interactions between xenobiotics and mammalian organisms. *Metallomics* 3:566–77 . doi: 10.1039/c1mt00037c

Gómez Ariza J, García-Barrera T, Callejón-Leblic B, Rodríguez-Moro G (2018) Environmental Metabolomics and Toxicometabolomics in Marine Pollution Assessment. In: Gómez Ariza J., García Barrera T (eds) *Environmental problems in marine biology*. CRC Press

González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL (2014) Using direct infusion mass spectrometry for serum metabolomics in Alzheimer's disease. *Anal Bioanal Chem* 406:7137–48 . doi: 10.1007/s00216-014-8102-3

González-Domínguez R, Santos HM, Bebianno MJ, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL, Capelo JL (2016) Combined proteomic and metallomic analyses in *Scrobicularia plana* clams to assess environmental pollution of estuarine ecosystems. *Mar Pollut Bull* 113: . doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.08.075

González-Fernández M, García-Barrera T, Arias-Borrego A, Bonilla-Valverde D, López-Barea J, Pueyo C, Gómez-Ariza JL (2008a) Metal-binding molecules in the organs of *Mus musculus* by size-exclusion chromatography coupled with UV spectroscopy and ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 390:17–28 . doi: 10.1007/s00216-007-1690-4

González-Fernández M, García-Barrera T, Jurado J, Prieto-Álamo MJ, Pueyo C, López-Barea J, Gómez-Ariza JL (2008b) Integrated application of transcriptomics, proteomics, and metallomics in environmental studies. *Pure Appl Chem* 80:2609–2626 . doi: 10.1351/pac200880122609

González-Fernandez M, García-Sevillano MA, Jara-Biedma R, Navarro-Roldán F, García-Barrera T, López-Barea J, Pueyo C, Gomez-Ariza JL (2013) Use of metallomics in environmental pollution assessment using mice *mus musculus/mus spretus* as bioindicators. *Curr Anal Chem* 9:229–243

Goyer, R. A., Clarkson T (2001) Toxic effects of metals. Casarett and Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons. Kansas

Grandjean P, Brown SS, Reavey P, Young DS (1994) Biomarkers of chemical exposure: State of the art. In: *Clinical Chemistry*. pp 1360–1362

Gromski PS, Muhamadali H, Ellis DI, Xu Y, Correa E, Turner ML, Goodacre R (2015) A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal Chim Acta* 879:10–23 . doi: 10.1016/j.aca.2015.02.012

Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53:1–11

Harper JF, Abid KB, Ward JM, Rogers EE, Gong J, Schroeder JI, McIntyre L, Guerinot ML, Salt DE, Smith EL, Mahmoudian M, Lahner B (2003) Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* 21:1215–1221 . doi: 10.1038/nbt865

Hart CW, Fuller SLH (1974) *Pollution Ecology of Freshwater Invertebrates*. Academic Press

Hartwig A, Bolt HM, Levy L, Manno M, Papameletiou D, Klein CL (2010) Cadmium and its inorganic compounds

Hill CH, Matrone G (1970) Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. *Fed Proc* 29:1474–1481

Hille R (2002) Molybdenum and tungsten in biology. *Trends Biochem Sci* 27:360–367 . doi: 10.1016/S0968-0004(02)02107-2

Hodgson E (2004) *A Textbook of Modern Toxicology*. John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken (New Jersey)

Hodson P V. (2002) Biomarkers and Bioindicators in monitoring and assessment. In: Adams SM (ed) *Biological indicators of aquatic ecosystems stress*. American Fisheries Society, Maryland, U.S.A., pp 591–619

Ikemoto T, Kunito T, Anan Y, Tanaka H, Baba N, Miyazaki N, Tanabe S (2004) Association of heavy metals with metallothionein and other proteins in hepatic cytosol of marine mammals and seabirds. *Environ Toxicol Chem* 23:2008–2016 . doi: 10.1897/03-456

Issaq HJ (2001) The role of separation science in proteomics research. *Electrophoresis* 22:3629–3638

Issaq HJ, Blonder J (2009) Electrophoresis and liquid chromatography/tandem mass spectrometry in disease biomarker discovery. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life*

Sci 877:1222–8 . doi: 10.1016/j.jchromb.2008.12.028

Iwahashi Y, Hosoda H, Park JH, Lee JH, Suzuki Y, Kitagawa E, Murata SM, Jwa NS, Gu MB, Iwahashi H (2006) Mechanisms of patulin toxicity under conditions that inhibit yeast growth. *J Agric Food Chem* 54:1936–1942 . doi: 10.1021/jf052264g

Jameson G, Ibers J (2007) Biological and Synthetic Dioxxygen Carriers. In: Bertini I, Gray H, Stiefel I, Valentine J (eds) *Bioinorganic Chemistry*

Ji C, Wu H, Liu X, Zhao J, Yu J, Yin X (2013) The influence of salinity on toxicological effects of arsenic in digestive gland of clam *Ruditapes philippinarum* using metabolomics. *Chinese J Oceanol Limnol* 31: . doi: 10.1007/s00343-013-2124-0

Jia S, Kang YP, Park JH, Lee J, Kwon SW (2011) Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:9174–82 . doi: 10.1016/j.chroma.2011.10.040

Jihen EH, Fatima H, Nouha A, Baati T, Imed M, Abdelhamid K (2010) Cadmium retention increase: a probable key mechanism of the protective effect of zinc on cadmium-induced toxicity in the kidney. *Toxicol Lett* 196:104–9 . doi: 10.1016/j.toxlet.2010.04.006

Jones O, Dondero F, Viarengo A, Griffin J (2008) Metabolic profiling of *Mytilus galloprovincialis* and its potential applications for pollution assessment. *Mar Ecol Prog Ser* 369:169–179 . doi: 10.3354/meps07654

Junot C, Madalinski G, Tabet JC, Ezan E (2010) Fourier transform mass spectrometry for metabolome analysis. *Analyst* 135:2203–2219 . doi: 10.1039/c0an00021c

Kaderbhai NN, Broadhurst DI, Ellis DI, Goodacre R, Kell DB (2003) Functional genomics via metabolic footprinting: monitoring metabolite secretion by *Escherichia coli* tryptophan metabolism mutants using FT-IR and direct injection electrospray mass spectrometry. *Comp Funct Genomics* 4:376–91 . doi: 10.1002/cfg.302

Käkelä R, Käkelä A, Hyvärinen H (1999) Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Comp Biochem Physiol Part C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 123:27–37 . doi: 10.1016/S0742-8413(99)00006-7

Kamleh A, Barrett M, Wildridge D, Burchmore R, Scheltema R, Watson D (2008) Metabolomic profiling using Orbitrap Fourier transform mass spectrometry with hydrophilic interaction chromatography: A method with wide applicability to analysis of biomolecules. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22:1912–1918

Katajamaa M, Oresic M (2007) Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J Chromatogr A* 1158:318–28 . doi: 10.1016/j.chroma.2007.04.021

Kenyon EM, Hughes MF, Levander OA (1997) Influence of dietary selenium on the disposition of arsenate in the female B6C3F1, mouse. *J Toxicol Environ Health* 51:279–299

Kishi K, Kitagawa E, Onikura N, Nakamura A, Iwahashi H (2006) Expression analysis of sex-specific and 17 β -estradiol-responsive genes in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*, using oligonucleotide microarrays. *Genomics* 88:241–251 . doi: 10.1016/j.ygeno.2006.03.023

Kokushi E, Uno S, Harada T, Koyama J (2010) 1H NMR-Based Metabolomics Approach to Assess Toxicity of Bunker A Heavy Oil to Freshwater Carp, *Cyprinus carpio*. *Environ Toxicol* 27:404–414

Kopczynski D, Sickmann A, Ahrends R (2017) Computational proteomics tools for identification and quality control. *J Biotechnol* 261:126–130 . doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.1199

Krohn RM, Lemaire M, Negro Silva LF, Lemarié C, Bolt A, Mann KK, Smits JE (2016) High-selenium lentil diet protects against arsenic-induced atherosclerosis in a mouse model. *J Nutr Biochem* 27:9–15 . doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.07.003

Kufner M (1986) Tamaño, actividad, densidad relativa y preferencia de hábitat de los

pequeños y medianos mamíferos de Doñana como factores condicionantes de su tasa de predación. Universidad Autónoma de Madrid

Kuska B (1998) Beer, Bethesda, and biology: how “genomics” came into being. *J Natl Cancer Inst* 90:93 . doi: 10.1093/jnci/90.2.93

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford a, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan a, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian a, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson a, Deadman R, Deloukas P, Dunham a, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt a, Jones M, Lloyd C, McMurray a, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall a, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra M a, Mardis ER, Fulton L a, Chinwalla a T, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty a, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen a, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs R a, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama a, Hattori M, Yada T, Toyoda a, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal a, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump a, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan a, Qin S, Davis RW, Federspiel N a, Abola a P, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson M V, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans G a, Athanasiou M, Schultz R, Roe B a, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey J a, Bateman a, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR,

Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones T a, Kasif S, Kasprzyk a, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin E V, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght a, Mikkelsen T, Moran J V, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit a F, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams a, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld a, Wetterstrand K a, Patrinos a, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowski J (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921 . doi: 10.1038/35057062

Lane TW, Morel FM (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4627–4631 . doi: 10.1073/pnas.090091397

Le X (2000) Arsenic Speciation in the Environment and Humans. In: Marcel Dekker W (ed) *Environment Chemistry of Arsenic*. Frankenberger, Inc, New York, USA

Le X, Cullen W, Reimer K (1994) Human urinary arsenic excretion after one-time ingestion of seaweed. *Clin Chem* 40:617–624

Lederberg J, McCray A (2001) 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. *Scientist* 15:8–9

Leermakers M, Baeyens W, De Gieter M, Smedts B, Meert C, De Bisschop HC, Morabito R, Quevauviller P (2006) Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. *TrAC - Trends Anal Chem* 25:1–10 . doi: 10.1016/j.trac.2005.06.004

Leonzio C, Focardi S, Bacci E (1982) Complementary accumulation of selenium and mercury in fish muscle. *Sci Total Environ* 24:249–254 . doi: 10.1016/0048-9697(82)90003-1

Lezcano D, Concha G, Vahter M, Vogler G, Nermell B (2007) Exposure to Inorganic Arsenic Metabolites during Early Human Development. *Toxicol Sci* 44:185–190 . doi: 10.1093/toxsci/44.2.185

Li JL, Gao R, Li S, Wang JT, Tang ZX, Xu SW (2010) Testicular toxicity induced by dietary cadmium in cocks and ameliorative effect by selenium. *BioMetals* 23:695–705 . doi: 10.1007/s10534-010-9334-0

Li P, Wang S, Feng X, Qiu G, Shang L (2011) Mercury pollution in Wuchuan mercury mining area, Guizhou, Southwestern China: The impacts from large scale and artisanal mercury mining. *Environ Int* 42:59–66 . doi: 10.1016/j.envint.2011.04.008

Lindon J, Holmes E, Nicholson J (2004) Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 4:189–199

Liu X, Zhang L, You L, Cong M, Zhao J, Wu H, Li C, Liu D, Yu J (2011) Toxicological responses to acute mercury exposure for three species of Manila clam *Ruditapes philippinarum* by NMR-based metabolomics. *Environ Toxicol Pharmacol* 31: . doi: 10.1016/j.etap.2010.12.003

Liu Y, Zhang S-P, Cai Y-Q (2007) Cytoprotective effects of selenium on cadmium-induced LLC-PK₁ cells apoptosis by activating JNK pathway. *Toxicol Vitro* 21:677–684 . doi: 10.1016/j.tiv.2007.01.015

Livingstone DR (1993) Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 57:195–211

Livingstone DR, Kirchin MA, Wiseman A (1989) Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. *Xenobiotica* 19:1041–1062

Lobinski R, Becker JS, Haraguchi H, Sarkar B (2010) Metallomics: Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 82:493–504 . doi: 10.1351/PAC-REP-09-03-04

Lobinski R, Moulin C, Ortega R (2006) Imaging and speciation of trace elements in biological environment. *Biochimie* 88:1591–1604 . doi: 10.1016/j.biochi.2006.10.003

Łobiński R, Pereiro IR, Chassaigne H, Wasik A, Szpunar J (1998) Elemental speciation

and coupled techniques-towards faster and reliable analyses: Plenary lecture. *J Anal At Spectrom* 13:859–867

Longnecker MP, Gladen BC, Cupul-Uicab LA, Romano-Riquer SP, Weber J-P, Chapin RE, Hernández-Ávila M (2007) In utero exposure to the antiandrogen 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethylene (DDE) in relation to anogenital distance in male newborns from Chiapas, México. *Am J Epidemiol* 165:1015–1022 . doi: 10.1093/aje/kwk109

Lopez-Barea J (1995) Biomarkers in ecotoxicology: an overview. *Arch Toxicol* 17:57–79

López-Barea J, Pueyo C (1998) Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 399:3–15 . doi: 10.1016/S0027-5107(97)00262-5

Lower WR, Kendall RJ (2018) Sentinels species and sentinel bioassay. In: McCarthy JF, Shugart LR (eds) *Biomarkers of Environmental Contamination*. CRC Press, pp 309–332

Lu M, Wang H, Li XF, Lu X, Cullen WR, Arnold LL, Cohen SM, Le XC (2004) Evidence of hemoglobin binding to arsenic as a basis for the accumulation of arsenic in rat blood. *Chem Res Toxicol* 17:1733–1742 . doi: 10.1021/tx049756s

Marchini S (2002) Aquatic effects assessment: needs and tools. *Ann Ist Super Sanita* 38:119–129

Maret W (2010) Metalloproteomics, metalloproteomes, and the annotation of metalloproteins. *Metallomics* 2:117–25 . doi: 10.1039/b915804a

Maret W, Copsey M (2012) Metallomics: whence and whither. *Metallomics* 10:1017–9

Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA (2008) Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. *Environ Pollut* 151:631–640 . doi: 10.1016/j.envpol.2007.03.019

Matés J (2002) Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol* 34:439–458

McBee K, Bickham JW (2005) Petrochemical-related DNA damage in wild rodents detected by flow cytometry. *Bull Environ Contam Toxicol* 40:343–349 . doi: 10.1007/bf01689090

Milošević MD, Paunović MG, Matic MM, Ognjanović BI, Saičić ZS (2017) The ameliorating effects of selenium and vitamin C against fenitrothion-induced blood toxicity in Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 56:204–209 . doi: 10.1016/j.etap.2017.09.016

Moalla SMN, Awadallah RM, Rashed MN, Soltan ME (1997) Distribution and chemical fractionation of some heavy metals in bottom sediments of Lake Nasser. *Hydrobiologia* 364:31–40 . doi: 10.1023/A:1003112008122

Montes-Nieto R, Fuentes-Almagro CA, Bonilla-Valverde D, Prieto-Alamo M-J, Jurado J, Carrascal M, Gómez-Ariza JL, López-Barea J, Pueyo C (2007) Proteomics in free-living *Mus spretus* to monitor terrestrial ecosystems. *Proteomics* 7:4376–87 . doi: 10.1002/pmic.200700409

Montforts MHMM (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 . doi: 10.1897/1551-3793(2006)2[13:AOPABI]2.0.CO;2

Morales-Prieto N, Abril N (2017) REDOX proteomics reveals energy metabolism alterations in the liver of *M. spretus* mice exposed to p, p'-DDE. *Chemosphere* 186:848–863 . doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.057

Morales-Prieto N, Ruiz-Laguna J, Abril N (2018) Dietary Se supplementation partially restores the REDOX proteomic map of *M. spretus* liver exposed to p,p'-DDE. *Food Chem Toxicol* 114:292–301 . doi: 10.1016/j.fct.2018.02.047

Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R (2009) Metallomics: the concept and methodology. *Chem Soc Rev* 38:1119–38 . doi: 10.1039/b713633c

Moxon A (1938) The effect of arsenic on the toxicity of seleniferous grains. 88:447–457

Nagato EG, D'eon JC, Lankadurai BP, Poirier DG, Reiner EJ, Simpson AJ, Simpson MJ (2013) (1)H NMR-based metabolomics investigation of *Daphnia magna* responses to sub-lethal exposure to arsenic, copper and lithium. *Chemosphere* 93:331–7 . doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.04.085

Naz S, Moreira Dos Santos, DC García A, Barbas C (2014) Analytical protocols based on LC–MS, GC–MS and CE–MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. *Bioanalysis* 6:1657–1677

Nehru LB, Bansal MP (1997) Effect of selenium supplementation on the glutathione redox system in the kidney of mice after chronic cadmium exposures. *J Appl Toxicol* 17:81–84 . doi: 10.1002/(SICI)1099-1263(199701)17:1<81::AID-JAT398>3.0.CO;2-K

Newairy AA, El-Sharaky AS, Badreldeen MM, Eweda SM, Sheweita SA (2007) The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. *Toxicology* 242:23–30

Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (1999) “Metabonomics”: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29:1181–1189

Nordberg GF (2009) Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:192–200 . doi: 10.1016/j.taap.2009.03.015

Nurmi JT, Tratnyek PG, Sarathy V, Baer DR, Amonette JE, Pecher K, Wang C, Linehan JC, Matson DW, Penn RL, Driessen MD (2005) Characterization and properties of metallic iron nanoparticles: Spectroscopy, electrochemistry, and kinetics. *Environ Sci Technol* 39:1221–1230 . doi: 10.1021/es049190u

Ogra Y, Anan Y (2012) Selenometabolomics Explored by Speciation. *Biol Pharm Bull* 35:1863–1869 . doi: 10.1248/bpb.b212016

Parizek J, Ostadalova I (1967) The protective effect of small amounts of selenite in sublimate intoxication. *Experientia* 32:142–143

Peakall D (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3:157–160

Pennings SC, Bertness MD Salt Marsh Communities. In: Bertness MD, Gaines SD, Hay M (eds) *Marine Community Ecology*. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts

Prince RC, Younis HS, George GN, Glass RS, Gailer J, Pemberton JE, Ringwald SC, DeYoung DW, Aposhian HV, Pickering IJ (2002) A Metabolic Link between Arsenite and Selenite: The Seleno-bis(S -glutathionyl) Arsinium Ion . *J Am Chem Soc* 122:4637–4639 . doi: 10.1021/ja993064m

Purves D (1977) *Trace Element Contamination of the Environment*. Elsevier

Putri SP, Yamamoto S, Tsugawa H, Fukusaki E (2013) Current metabolomics: technological advances. *J Biosci Bioeng* 116:9–16

Raber G, Francesconi K, Irgolic K, Goessler W (2000) Determination of “arsenosugars” in algae with anion-exchange chromatography and an inductively coupled plasma mass spectrometer as element-specific detector. *Fresenius J Anal Chem* 367:181–188

Rahman K (2007) Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging* 2:219–236

Rahman MM, Kurasaki M, Hosokawa T, Binte Hossain KF, Sikder MT, Saito T (2018) Inhibitory effects of selenium on cadmium-induced cytotoxicity in PC12 cells via regulating oxidative stress and apoptosis. *Food Chem Toxicol* 114:180–189 . doi: 10.1016/j.fct.2018.02.034

Rahman S, Kim K-H, Saha SK, Swaraz AM, Paul DK (2014) Review of remediation techniques for arsenic (As) contamination: Anovel approach utilizing bio-organisms. *J Environ Manage* 134: . doi: 10.1016/j.jenvman.2013.12.027

Raymond L, Ralston N (2004) Observations on the level of total Hg and Se in species common to the fisheries of Seychelles. *Seychelles Med Dent J* 7:56–60

Rinalducci S, Murgiano L, Zolla L (2008) Redox proteomics: Basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *J Exp Bot* 59:3781–3801 . doi: 10.1093/jxb/ern252

Romero-Ruiz A, Carrascal M, Alhama J, Gómez-Ariza JL, Abian J, López-Barea J (2006) Utility of proteomics to assess pollutant response of clams from the Doñana bank of Guadalquivir Estuary (SW Spain). *Proteomics* 6 Suppl 1:S245-255

Römisch-Margl W, Prehn C, Bogumil R, Röhring C, Suhre K, Adamski J (2012) Procedure for tissue sample preparation and metabolite extraction for high-throughput targeted metabolomics. *Metabolomics* 8:133–142 . doi: 10.1007/s11306-011-0293-4

Rossmann TG, Uddin AN (2004) Selenium prevents spontaneous and arsenite-induced mutagenesis. *Int Congr Ser* 1275:173–179 . doi: 10.1016/j.ics.2004.09.038

Ruiz-Laguna J, Abril N, Prieto-Álamo MJ, López-Barea J, Pueyo C (2004) Tissue, species, and environmental differences in absolute quantities of murine mRNAs coding for alpha, mu, omega, pi, and theta glutathione S-transferases. *Gene Expr* 12:165–176

Ruiz-Laguna J, García-Alfonso C, Peinado J, Moreno S, Ieradi LA, Cristaldi M, López-Barea J (2001) Biochemical bio markers of pollution in Algerian mouse (*Mus spretus*) to assess the effects of the Aznalcóllar disaster on Doñana Park (Spain). *Biomarkers* 6:146–160

Sah S, Vandenberg A, Smits J (2013) Treating chronic arsenic toxicity with high selenium lentil diets. *Toxicol Appl Pharmacol* 272:256–262 . doi: 10.1016/j.taap.2013.06.008

Saïd L, Banni M, Kerkeni A, Saïd K, Messaoudi I (2010) Influence of combined treatment with zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. *Food Chem Toxicol* 48: . doi: 10.1016/j.fct.2010.07.003

Salt D, Baxter I, Lahner B (2008) Ionomics and the Study of the Plant Ionome. *Annu Rev Plant Biol* 59:709–733

Salt DE (2004) Update on Plant Ionomics. *Plant Physiol* 136:2451–2456 . doi: 10.1104/pp.104.047753

Sanz-Medel A (2004) Entering Proteomics from Trace Element Speciation Research. In: *International Symposium Analytical Forum*

Schauer N, Steinhauser D, Strelkov S, Schomburg D, Allison G, Moritz T, Lundgren K, Roessner-Tunali U, Forbes MG, Willmitzer L, Fernie AR, Kopka J (2005) GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Lett* 579:1332–7 . doi: 10.1016/j.febslet.2005.01.029

Sharma VK, Sohn M (2009) Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environ Int* 35:743–759 . doi: 10.1016/j.envint.2009.01.005

Shi H, Shi X, Liu KJ (2004) Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 255:67–78

Shi X, Wei X, Koo I, Schmidt RH, Yin X, Kim SH, Vaughn A, McClain CJ, Arteel GE, Zhang X, Watson WH (2014) Metabolomic analysis of the effects of chronic arsenic exposure in a mouse model of diet-induced Fatty liver disease. *J Proteome Res* 13:547–54

Shiomi K (1994) *Arsenic in the Environment, Part 2: Human Health and Ecosystem Effects*. John Wiley & Sons, Inc.

Sies H (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chemie Int Ed English* 25:1058–1071

Singh O V., Nagaraj NS (2006) Transcriptomics, proteomics and interactomics: Unique approaches to track the insights of bioremediation. *Briefings Funct Genomics Proteomics* 4:355–362 . doi: 10.1093/bfpgp/eli006

Snape JR, Maund SJ, Pickford DB, Hutchinson TH (2004) Ecotoxicogenomics: The challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat Toxicol*

67:143–154 . doi: 10.1016/j.aquatox.2003.11.011

Soga T (2007) Capillary electrophoresis-mass spectrometry for metabolomics. *Methods Mol Biol* 358:129–137

Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T (2003) Quantitative Metabolome Analysis Using Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. *J Proteome Res* 2:488–494

Sørmo EG, Ciesielski TM, Øverjordet IB, Lierhagen S, Eggen GS, Berg T, Jenssen BM (2011) Selenium moderates mercury toxicity in free-ranging freshwater fish. *Environ Sci Technol* 45:6561–6566 . doi: 10.1021/es200478b

Steinberg CEW, Geyer HJ, Kettrup AAF (1994) Evaluation of xenobiotic effects by ecological techniques. *Chemosphere* 28:357–374 . doi: 10.1016/0045-6535(94)90133-3

Sun G, Yang K, Zhao Z, Guan S, Han X, Gross RW (2007) Shotgun metabolomics approach for the analysis of negatively charged water-soluble cellular metabolites from mouse heart tissue. *Anal Chem* 79:6629–40 . doi: 10.1021/ac070843+

Sun HJ, Rathinasabapathi B, Wu B, Luo J, Pu LP, Ma LQ (2014) Arsenic and selenium toxicity and their interactive effects in humans. *Environ Int* 69:148–158 . doi: 10.1016/j.envint.2014.04.019

Suwondo A, Achmadi UF, Suratman (2017) The effect of selenium supplementation on hemoglobin among farmers working as pesticide sprayers. *Adv Sci Lett* 23:3361–3363 . doi: 10.1166/asl.2017.9107

Szpunar J (2000) Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst* 125:963–988

Szpunar J (2004) Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem* 378:54–6 . doi: 10.1007/s00216-003-2333-z

Szpunar J (2005) Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis:

metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst* 130:442–65 . doi: 10.1039/b418265k

Tainer JA, Roberts VA, Getzoff ED (1991) Metal-binding sites in proteins. *Curr Opin Biotechnol* 2:582–591 . doi: 10.1016/0958-1669(91)90084-l

Talmage SS, Walton BT (1991) Small Mammals as Monitors of Environmental Contaminants. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. pp 47–145

Tan G, Kurasaki M, Rahman MM, Hosokawa T, Sikder MT, Saito T, Uson-Lopez RA (2017) Ameliorative effects of selenium on arsenic-induced cytotoxicity in PC12 cells via modulating autophagy/apoptosis. *Chemosphere* 196:453–466 . doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.149

Taylor H (2001) Inductively coupled plasma-mass spectrometry: Practices and techniques. *J Chem Educ* 78:1465

Tchounwou PB, Centeno J a, Patlolla AK (2004) Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis—a health risk assessment and management approach. *Mol Cell Biochem* 255:47–55 . doi: 10.1023/B:MCBI.0000007260.32981.b9

Templeton DM, Ariese F, Cornelis R, Danielsson LG, Muntau H, Van Leeuwen HP, Łobiński R (2000) Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000). *Pure Appl. Chem.* 72:1453–1470

Timbrell JA (2001) *Principles of Biochemical Toxicology*. Taylor & Francis, London, UK

Tsuchiya T, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Tokunaga H, Sakimoto K, Ando M, Umeda M (2005) Inorganic arsenic compounds and methylated metabolites induce morphological transformation in two-stage BALB/c 3T3 cell assay and inhibit metabolic cooperation in V79 cell assay. *Toxicol Sci* 84:344–351 . doi: 10.1093/toxsci/kfi082

Tull-Singleton S, Kimball S, McBee K (1994) Correlative analysis of heavy metal

bioconcentration and genetic damage in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) from a hazardous waste site. *Bull Environ Contam Toxicol* 52:667–672 . doi: 10.1007/BF00195485

Underwood A, Peterson C (1988) Towards an ecological framework for investigating pollution. *Mar Ecol - Prog Ser* 46:227–234

Usero J, Gracia I (1997) Trace Metals in the Bivalve Molluscs *Ruditapes Decussatus* and *Ruditapes* From the Atlantic Coast of. *Science (80-)* 23:291–298

Vahter M (1999) Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Sci Prog* 82:69–88

Vahter M (2002) Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 181–182:211–217

Viant MR (2008) Recent developments in environmental metabolomics. 4:980–986

Viant MR, Sommer U (2012) Mass spectrometry based environmental metabolomics: a primer and review. *Metabolomics* 9:144–158 . doi: 10.1007/s11306-012-0412-x

Vioque-Fernández A, Alves de Almeida E, López-Barea J (2009) Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Sci Total Environ* 407:1784–97 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.051

Vioque-Fernández A, de Almeida EA, Ballesteros J, García-Barrera T, Gómez-Ariza J-L, López-Barea J (2007) Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicol Lett* 168:260–8 . doi: 10.1016/j.toxlet.2006.10.023

Vuckovic D (2012) Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 403:1523–48 . doi: 10.1007/s00216-012-6039-y

Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB (1997) *Principles of Ecotoxicology*. CRC

Press, London, UK

Watson AD (2006) Thematic review series: Systems Biology Approaches to Metabolic and Cardiovascular Disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *J Lipid Res* 47:2101–2111 . doi: 10.1194/jlr.R600022-JLR200

Weaver P, Laures A, Wolff J (2007) Investigation of the advanced functionalities of a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time of flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21:2415–2421

Weeks J (1998) Effects of pollutants on soil invertebrates: Links between levels. In: Schüürmann G, Market B (eds) *Ecotoxicology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, pp 645–664

Williams RJ. (2001) Chemical selection of elements by cells. *Coord Chem Rev* 216–217:583–595 . doi: 10.1016/S0010-8545(00)00398-2

Winski S, Carter D (1995) Interactions of rat red blood cellsulfhydryls with arsenate andarsenite. *J Toxicol andEnvironmental Heal* 46:379–397

World Health Organization (WHO) (2010) Safety evaluation of certain food additives and contaminants in food. Geneva

Wu H, Liu X, Zhang X, Ji C, Zhao J, Yu J (2013) Proteomic and metabolomic responses of clam *Ruditapes philippinarum* to arsenic exposure under different salinities. *Aquat Toxicol* 136–137:91–100 . doi: 10.1016/j.aquatox.2013.03.020

Wu H, Liu X, Zhao J, Yu J (2011) NMR-based metabolomic investigations on the differential responses in adductor muscles from two pedigrees of Manila clam *Ruditapes philippinarum* to Cadmium and Zinc. *Mar Drugs* 9:1566–79

Xiao M, Yang J, Feng Y, Zhu Y, Chai X, Wang Y (2017) Metaproteomic strategies and applications for gut microbial research. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:3077–3088 . doi: 10.1007/s00253-017-8215-7

Yanes O, Tautenhahn R, Patti GJ, Siuzdak G (2011) Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. *Anal Chem* 83:2152–61 . doi: 10.1021/ac102981k

Yang L, Wang W, Hou S, Peterson PJ, Williams WP (2002) Effects of selenium supplementation on arsenism: An intervention trial in inner Mongolia. *Environ Geochem Health* 24:359–374 . doi: 10.1023/A:1020514826108

Yoshizawa K, Rimm EB, Morris JS, Spate VL, Hsieh C, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC (2002) Mercury and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 347:1755–60 . doi: 10.1056/NEJMoa021437

Zhai Q, Wang G, Zhao J, Liu X, Tian F, Zhang H, Chen W (2013) Protective effects of *Lactobacillus plantarum* ccfm8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Appl Environ Microbiol* 79:1508–1515 . doi: 10.1128/AEM.03417-12

Zhang L, Liu X, You L, Zhou D, Wu H, Li L, Zhao J, Feng J, Yu J (2011a) Metabolic responses in gills of Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to copper using NMR-based metabolomics. *Mar Environ Res* 72:33–9 . doi: 10.1016/j.marenvres.2011.04.002

Zhang L, Liu X, You L, Zhou D, Yu J, Zhao J, Feng J, Wu H (2011b) Toxicological Effects Induced by Cadmium in Gills of Manila Clam *Ruditapes philippinarum* Using NMR-Based Metabolomics. *Clean - Soil, Air, Water* 39: . doi: 10.1002/clen.201100208

Zhang N, Venkateshwaran M, Boersma M, Harms A, Howes-Podoll M, den Os D, Ané J-M, Sussman MR (2012) Metabolomic profiling reveals suppression of oxylipin biosynthesis during the early stages of legume-rhizobia symbiosis. *FEBS Lett* 586:3150–8

Zhang P, Xu XY, Chen YP, Xiao MQ, Feng B, Tian KX, Chen YH, Dai YZ (2018) Protein corona between nanoparticles and bacterial proteins in activated sludge: Characterization and effect on nanoparticle aggregation. *Bioresour Technol* 250:10–16 . doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.008

Zhnag P, Zhu J, Xu X, Qing T, Dai Y, Feng B (2019) Identification and function of

extracellular protein in wastewater treatment using proteomic approaches: a mini review.

J Environ Manage 233:24–29

Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Ransom HW (2012) LC-MS-based metabolomics. Mol Biosyst

470–481 . doi: 10.1039/c1mb05350g

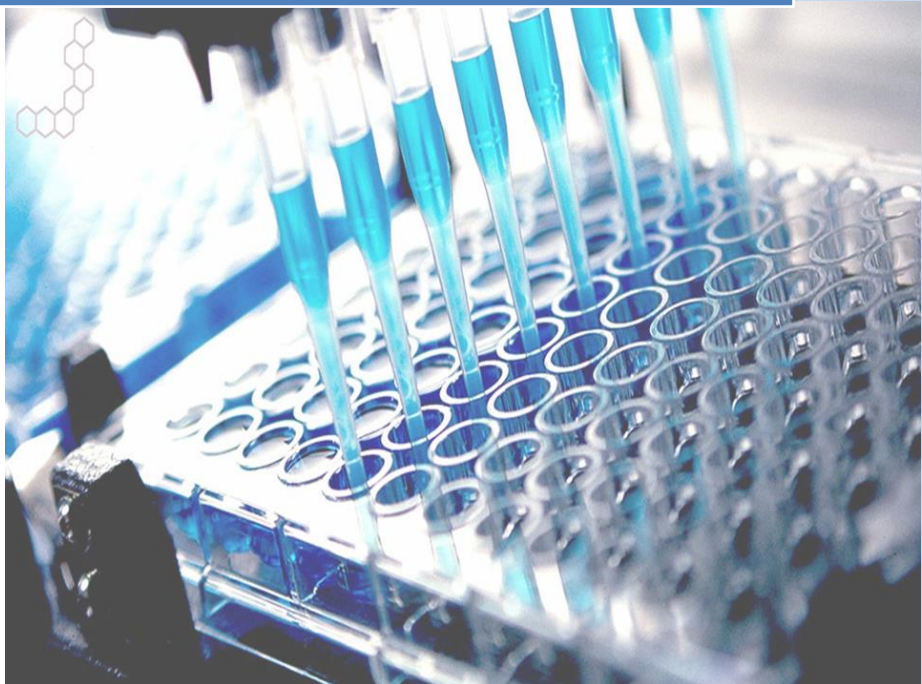
Zhou Y jing, Zhang S ping, Liu C wei, Cai Y qing (2009) The protection of selenium on ROS mediated-apoptosis by mitochondria dysfunction in cadmium-induced LLC-PK1 cells.

Toxicol Vitr 23:288–294 . doi: 10.1016/j.tiv.2008.12.009

(2002) Toxicological Profile: for DDT,DDD, and DDE. Agency for toxic substance and disease registry

3. OBJETIVOS

Objectives



3. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral considera la evaluación del impacto de las especies contaminantes en organismos que puedan emplearse como bioindicadores de estrés medioambiental frente a este tipo de sustancias. Dicho objetivo general engloba los siguientes objetivos concretos:

- i. Realizar ensayos de exposición en el laboratorio a diferentes tipos de especies contaminantes (orgánicas e inorgánicas) para establecer los mecanismos de acción de dichos contaminantes en organismos modelo mediante la integración de metodologías *ómicas*.
- ii. Evaluar la respuesta biológica del bioindicador *Scrobicularia plana* a la exposición a arsénico mediante un enfoque metalo-metabólico basado en el uso de plataformas analíticas complementarias, como HPLC-ICP-MS y DIMS, con el apoyo del tratamiento estadístico de los datos mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para obtener una visión más profunda del metabolismo del arsénico en este organismo acuático.
- iii. Búsqueda de biomarcadores metabólicos de contaminación mediante el empleo de técnicas metabólicas complementarias, DI-ESI-QTOF-MS y GC-MS, asociados a la respuesta biológica del bivalvo *Scrobicularia plana*, utilizado como bioindicador de estrés medioambiental en el estuario de Río Guadalquivir, con diferentes niveles de contaminación por su proximidad a zonas agrícolas, mineras e industrial.

OBJETIVOS

- iv. Estudio de la respuesta biológica de los organismos modelo *Mus musculus* y *Mus Spretus* sometidos a experiencias de exposición con contaminantes tanto de tipo inorgánico (Cd) como orgánico (DDE), en experiencias controladas de laboratorio, con objeto de identificar posibles perturbaciones de diferentes rutas metabólicas. Para ello, se integrarán metodologías de análisis masivo, metalómica y metabolómica, basadas en el uso de la espectrometría de masas elemental y molecular. Evaluación del efecto protector del Se.

- v. Estudio proteómico en hígado del ratón de laboratorio *Mus musculus*, sometido a experiencias de exposición a cócteles de metales, como iAs; Cd; y Hg. Evaluación de los niveles de expresión de dichas proteínas alteradas en el ratón *Mus musculus*. Además, se evaluarán las interacciones antagonistas con Se.

OBJECTIVES

The general objective of this doctoral thesis is to evaluate the impact of contaminating species on organisms that can be used as bioindicators of environmental stress against these compounds. This general development includes the following specific objectives:

- i. Experimental exposure to different types of contaminating chemical species (organic and inorganic) to know the mechanisms of action of these pollutants on model organisms using the integration of *-omics* approaches.
- ii. Study the biological response of bioindicator *Scrobicularia plana* after arsenic exposure with metallo-metabolomic approaches using complementary analytical platforms, such as HPLC-ICP-MS and DIMS, combined with the statistical treatment of partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) to get a deeper insight into the metabolism of arsenic in this organism.
- iii. Search of metabolomic biomarkers of environmental pollution using complementary metabolomic techniques, DI-ESI-QTOF-MS and GC-MS, related to the biological response of the bivalve *Scrobicularia plana*, used as a bioindicator of environmental stress of Guadalquivir river estuary, which shows different levels of contamination due to its proximity to agricultural, mining and industrial areas.
- iv. Study of the biological response of the *Mus Musculus* mice after experimental exposure under controlled laboratory conditions to inorganic pollutants, as Cd, and the organochlorine compound DDE, respectively, in order to identify possible perturbances of different metabolic pathways. To this end, *-omics* methodologies based on the use of elemental and molecular mass spectrometry will be integrated. In addition, the protective effect of Se on

these affected routes by the toxic effects of Cd and DDE was measured, using *-omic* methodologies, when this element is supplied to different concentration levels.

- v. Proteomic study in the liver of the laboratory mice *Mus musculus*, considered the organ with the highest metabolic activity, after exposure experiments to metal cocktails, such as As; Cd; and Hg. The identification of differential proteins will be carried out by mass spectrometry using the nanoLC-ESI-TOF-MS/MS coupling to determine the expression levels of these altered proteins in the *Mus musculus*. In addition, antagonistic interactions with Se will also be evaluated.

4. PARTE EXPERIMENTAL

Experimental



4. PARTE EXPERIMENTAL. Instrumentación y metodología

En esta sección se describen las distintas técnicas y las metodologías empleadas a lo largo de la Tesis Doctoral.

4.1. Instrumentación empleada para la preparación de muestras

Para las muestras de órganos se requiere una etapa previa de homogenización utilizando un criohomogenizador modelo SPEX SamplePrep Freezer/Mill 6770 (Metuchen, Nueva Jersey, EE.UU.).

La mineralización de las muestras para la determinación multielemental en los tejidos y suero, se ha llevado en un horno microondas modelo MARS5 (CEM corporation, Matthews, Carolina del Norte, Estados Unidos) equipado con reactores cerrados de teflón modelo MARS Xpress. El extracto resultante del ataque de las muestras se filtra a través de filtros Iso-Disc de politetrafluoroetileno (PTFE) de 25 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro (Sigma Aldrich) antes de su análisis.

Para favorecer la extracción de las especies químicas a partir de los tejidos se utiliza una sonda de ultrasonidos modelo Sonoplus HD 2200 (Bandelin, Berlín), equipada con una punta MS72. La preparación de los extractos citosólicos para la determinación metabolitos se ha llevado a cabo con un homogenizador *pellet mixer* (VWR International) en el caso de los órganos. En cambio, para la extracción de metabolitos en muestras de suero se ha empleado un vortex para la homogenización de las muestras y un sistema SpeedVac (SpeedVacTM Thermo Scientific) para la preconcentración de los analitos.

Para la digestión de proteínas, se utilizó un mini incubador Labnet (New Jersey, USA) para la reducción y alquilación de las proteínas.

4.2. Instrumentación empleada en el análisis de muestras

La técnica analítica más empleada en el análisis de muestras en esta Tesis Doctoral es la espectrometría de masas, en sus dos modalidades: espectrometría de masas elemental y espectrometría de masas orgánica.

El análisis de trazas de metales en los tejidos y fluidos biológicos se ha llevado a cabo con un espectrómetro de masas atómico con plasma acoplado inductivamente, ICP-MS Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokio, Japón) equipado con una celda de colisión/reacción de tipo octapolo (ORC), que permite reducir significativamente las interferencias poliatómicas formadas a partir de la matriz de la muestra, reactivos utilizados para la preparación de muestra o gases del plasma. En la celda se utiliza He como gas de colisión e H₂ como gas de reacción.

La determinación de las especies de As fue llevada a cabo mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS empleando el sistema HPLC1100 Series de Agilent (Wilmington, DE, EE.UU), equipado con una válvula de inyección modelo 7725i Rheodyne (Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU) y bomba cuaternaria. La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna de intercambio aniónico Hamilton PRP-X100 (25cm x 4.6 mm x 10 µm).

Por último, los estudios proteómicos se llevaron a cabo con un espectrómetro de masas UHR-QqTOF IMPACT HD (Ultra-High Resolution Qq-Time-Of-Flight) de Bruker Daltonics (Bremen, Germany). La separación cromatográfica de los péptidos se llevó a cabo utilizando un sistema Ultimate™ 3000 nanoLC equipado con una columna Acclaim PepMap 100 (Thermo Fisher Scientific) y una columna Acclaim™ PepMap™ 100 C18 (Thermo Fisher Scientific).

4.3. Experiencias con organismos modelo

4.3.1. Experiencias de exposición en ratones

Los ratones *Mus musculus* y *Mus spretus* sometidos a las distintas experiencias de exposición fueron manipulados de acuerdo con las normas establecidas por la Comunidad Europea y bajo la aprobación por el Comité Ético de las Universidades de Huelva y Córdoba. Los ratones se mantuvieron en jaulas metabólicas acondicionadas durante todo el experimento con ciclos de luz/oscuridad cada 12/24 horas y temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) y con un período de aclimatación de cinco días antes de comenzar los diferentes experimentos. Se utilizaron ratones machos de 7-9 semanas de edad y de 15-20 gramos aproximadamente de peso. Los ratones fueron alimentados con una dieta estándar suministrada por Harlan Laboratories Inc. IN 46250 de baja concentración en metales (Indianápolis, Estados Unidos) y agua “*ad libitum*” a lo largo de todo el experimento, con un período de cinco días para lograr su aclimatación. Los ratones *Mus musculus*, variedad BALB/cByJ, fueron suministrados por Charles River (Barcelona, España); mientras que los ratones *Mus spretus*, variedad SPRET/Ei, fueron suministrados por los laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME, USA).

Transcurrido el tiempo de exposición establecido en los distintos diseños de exposición, los ratones fueron sacrificados por punción cardiaca (con anestesia previa por inhalación de isoflurano) o mediante dislocación cervical. Posteriormente los animales se diseccionaron utilizando un escarpelo de cerámica, y los diferentes órganos se lavaron en placas de vidrio con suero fisiológico para eliminar los restos de sangre y otros fluidos biológicos antes de su congelación en nitrógeno líquido. Finalmente, los órganos se almacenaron a -80°C hasta sus análisis. La obtención de suero se realizó sin la adición de anticoagulante, por centrifugación a 12000 rpm una vez incubadas las muestras durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad.

Para los estudios de exposición por vía subcutánea se emplearon jeringas de insulina de 1 mL con aguja de 0,33 mm x 12 mm (Figura 19). En cambio, en los estudios de exposición por vía oral, se empleó una cánula gástrica para roedores (Figura 19).

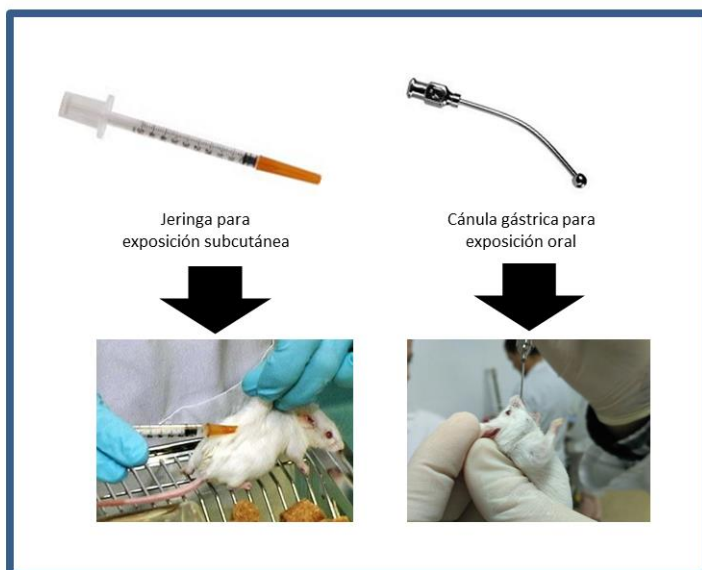


Figura 19. Accesorios empleados para los experimentos de exposición vía subcutánea (izquierda) y vía oral (derecha).

4.3.1.1. Experiencia de exposición a Cd/Se

Para esta experiencia de exposición, se utilizaron un total de 20 ratones *Mus musculus*, los cuales fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos con diferentes niveles de exposición a Selenio, en forma de selenito sódico; y/o cadmio, en forma de cloruro de cadmio durante 12 días: (A) GRUPO A (CONTROL, ↓Se), expuesto a una dosis de 0.15 mg/kg de Se por peso/día; (B) GRUPO B (↑Se), expuesto a una dosis de 0.5 mg/kg de Se por peso/día; (C) GRUPO C (↓Se+Cd), 0.15 mg/kg de Se por peso/día y 0.1 mg/kg de Cd por peso/día y finalmente, (D) GRUPO D (↑Se+Cd), 0.5 mg/kg de Se por peso/día y 0.1 mg/kg de Cd por peso/día. Cadmio fue administrado subcutáneamente en forma de cloruro de cadmio (CdCl_2) y selenio fue administrado oralmente como selenito (SeO_3^{2-}). El pienso usado para la alimentación de los ratones

se trataba de un pienso sin contenido en Se. La dosis suplementada de Se fue seleccionada considerando alrededor de 3 veces la cantidad de selenio normal en la dieta de roedores y la dosis de Cd fue seleccionada teniendo en cuenta los valores de LD₅₀ para este compuesto (García-Sevillano et al. 2015b; García-Sevillano et al. 2015a; Morales-Prieto et al. 2018). La figura 20 muestra el esquema del experimento de exposición.

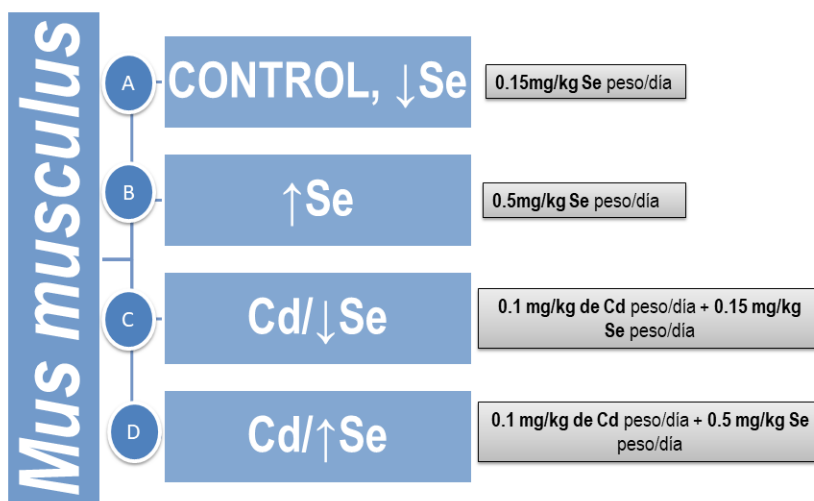


Figura 20. Experiencia de exposición a Cd y Se en ratones *Mus Musculus*.

4.3.1.2. Experiencia de exposición a DDE y Se

En esta experiencia se utilizaron un total de 20 ratones *Mus spretus* divididos en cuatro grupos: (A) GRUPO CONTROL; (B) GRUPO DDE, expuestos a una dieta suplementada de DDE (150 mg/kg DDE en pienso); (C) GRUPO Se, con una dieta suplementada de selenito (4 mg/kg Se en pienso); y por último (D) GRUPO DDE/Se, sometidos a una dieta suplementada de DDE y selenito (con la misma ingesta que los grupos anteriores). La dosis suplementada de Se fue seleccionada considerando alrededor de 3 veces la cantidad de selenio normal en la dieta de roedores y la dosis de DDE fue seleccionada teniendo en cuenta los valores de LD₅₀ para este compuesto (Pasha 1981; Morales-Prieto et al. 2018). La comida y el agua se retiraron

cada dos días y se registró la cantidad consumida para estimar el consumo diario de DDE y Se durante los 30 días de exposición. La figura 21 muestra el esquema de exposición a estos compuestos.

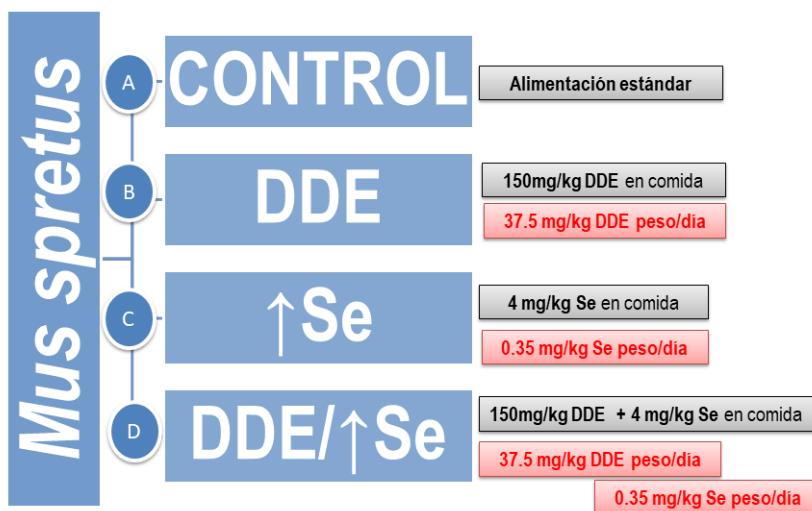


Figura 21. Experiencia de exposición a DDE y Se en ratones *Mus Spretus*.

4.3.1.3. Experiencia de exposición a As, Cd, Hg y Se.

Se utilizaron un total de 20 ratones *Mus musculus* divididos en cuatro grupos, un grupo control y tres grupos de exposición: (A) GRUPO CONTROL, expuesto oralmente a 0.9% NaCl; (B) ↑Se, expuesto oralmente a una dosis de 0.5 mg/kg de Se por peso/día; (C) GRUPO METALES (As, Cd y Hg), expuesto oralmente a un cóctel de metales conteniendo 0.1 mg/Kg de Cd por peso/día + 0.2 mg/Kg de Hg por peso/día + 3 mg/Kg de As por peso/día, y finalmente, (D) GRUPO METALES + Se, expuesto diariamente a las mismas dosis de metales que el grupo anterior y suplementado con una dosis de 0.5 mg/kg de Se por peso/día. El As fue administrado en forma de As_2O_3 , el Cd en forma de $CdCl_2$, el Hg como $HgCl_2$ y el Se en forma de selenito (Na_2SeO_3). Las dosis orales de cada compuesto fueron seleccionadas para no sobrepasar los valores de LD_{50} durante todo el experimento de exposición (10

días) (García-Sevillano et al. 2013; García-Sevillano et al. 2014; García-Sevillano et al. 2015a). La figura 22 muestra un esquema del experimento de exposición.

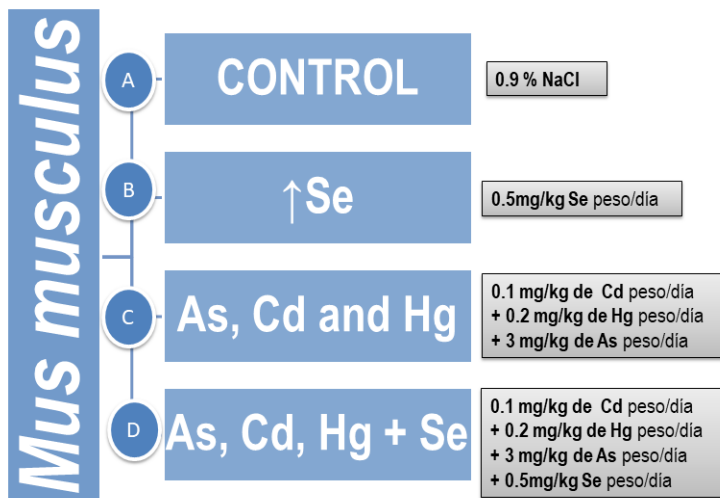


Figura 22. Experiencia de exposición a cóctel de metales (As, Cd y Hg) y Se en ratones *Mus musculus*.

4.3.2. Experiencias de exposición a As en el bivalvo *Scrobicularia plana*

En el estudio se utilizó un total de 30 especímenes del bivalvo *Scrobicularia plana*, las cuales fueron muestreadas en el Parque Natural “Bahía de Cádiz”, una zona medioambientalmente protegida. Después del muestreo, los organismos tuvieron un periodo de aclimatación de 7 días en acuarios de 30 L de capacidad en condiciones semiestáticas con agua de mar con sistema de recirculación de agua y aire. Las almejas fueron divididas en tres grupos: (A) GRUPO CONTROL, sin exposición; (B) GRUPO As10, en el cuál los organismos fueron expuestos a $10 \mu\text{gL}^{-1}$ de As disuelto en el agua del acuario; y finalmente (C) GRUPO As100, expuesto a $100 \mu\text{gL}^{-1}$ de As disuelto en el agua recirculatoria del acuario. Estas dos concentraciones de As fueron seleccionadas considerando, en primer lugar, los niveles de As en agua de mar en áreas contaminadas, y la concentración más alta para buscar los mecanismos

involucrados en el modo de acción tóxico (MOA) de este elemento (Sadiq 1992; Kennish 2002). La experiencia de exposición se llevó a cabo durante un periodo de 14 días. A lo largo de este tiempo, 3 especies de cada grupo de estudio fueron muestreadas para estudiar la evolución de los efectos tóxicos con el tiempo: tiempo cero (T0); después de 24h de exposición (T1); a los 7 días (T7) y finalmente a los 14 días (T14). Después de la exposición, las almejas se diseccionaron para extraer la glándula digestiva, que se almacenaron a -80°C hasta sus análisis. Los parámetros físico/químicos fueron evaluados diariamente para mantener las condiciones del experimento, oxígeno disuelto (8.8 ± 0.6 mg/L), pH (8.20 ± 0.04), salinidad (34.18 ± 0.10 psu) y temperatura (17.5 ± 0.2 °C). La figura 23 muestra el esquema de la experiencia de exposición.

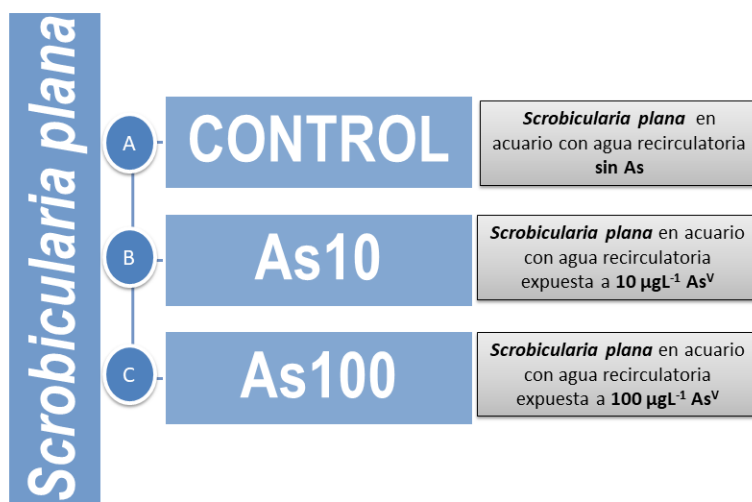


Figura 23. Experiencia de exposición a As en el bivalvo *Scrobicularia plana*.

4.3.3. Muestreo del bivalvo *Scrobicularia plana* en el estuario del Río Guadalquivir.

Las muestras de *Scrobicularia plana* empleadas en el estudio fueron muestreadas en dos estaciones de muestreo diferentes situadas en el estuario del Río Guadalquivir, al suroeste de la Península (Figura 24). Dicho estuario se encuentra afectado por el

área metropolitana de la ciudad de Sevilla, con una población total de 1.400.000 habitantes, y que por lo tanto se ha caracterizado previamente como una fuente de contaminación urbana e industrial (Mendiguchía et al. 2007). Las estaciones de muestreo seleccionadas fueron: *Sitio 1*: "Brazo de la Torre" (BLT), en el cuál estudios previos llevados a cabo han demostrado altos niveles de metales en los sedimentos debido a la proximidad a las áreas con actividad minera, que sufrieron la entrada de lodos contaminados con metales durante la ruptura del relave de la mina Aznalcóllar en 1998 (Gómez-Parra et al. 2000; Sáenz et al. 2003), habiendo verificado que los niveles de metales seguían siendo altos diez años después del episodio contaminación ambiental (Tornero et al. 2011); y, *Sitio 2* "La Pantoca" (PAN), ubicada relativamente cerca de la desembocadura del estuario del río Guadalquivir.

Los especímenes de *S. plana* (10 individuos por punto de muestreo, con tamaño y peso homogéneo) fueron manualmente muestreadas en la primavera de 2015 y transportadas vivas al laboratorio en contenedores fríos (4°C). Posteriormente, la carne se separó de la cáscara y las almejas se diseccionaron para obtener la glándula digestiva, se lavaron con una solución 0.9% NaCl y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.



Figura 24. Área de muestreo en el estuario del río Guadalquivir (suroeste de España); *Sitio 1*: "Brazo de la Torre"-BLT (punto rojo); *Sitio 2*: "La Pantoca"-PAN (punto verde).

4.4. Procedimientos analíticos para análisis multielemental

4.4.1. Preparación de muestras para análisis multielemental

Para llevar a cabo la mineralización de los diferentes tejidos (previamente pulverizados) y fluidos biológicos, se pesaron exactamente 100 mg de cada uno de ellos, en reactores de teflón MiniExpress de 5 mL del microondas MARS5 (CEM) y se añadieron 500 μ L de una mezcla (4:1 v/v) de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno. Transcurridos 10 minutos de pre-digestión en el recipiente abierto, los vasos de PTFE (politetrafluoretileno) se cierran y se introducen en el horno microondas. La mineralización se llevó a cabo a 400 W utilizando una rampa de temperatura desde temperatura ambiente a 160 ° C durante 15 minutos y manteniendo esta última durante 20 minutos. A continuación, los extractos mineralizados se diluyen con agua ultrapura (MilliQ) hasta una cantidad apropiada dependiendo de la sensibilidad que requiera el análisis. Por último, las muestras se filtran con filtros de jeringa de 0,45 μ m de teflón (PTFE) para evitar de esta forma la adsorción metálica durante el proceso, y se llevó a cabo la determinación multielemental mediante ICP-MS. Todos los análisis se realizaron por triplicado. El método de extracción fue validado con materiales de referencia certificados (García-Sevillano et al. 2015b).

4.4.2. Análisis multielemental mediante ICP-ORS-MS

La cuantificación multielemental en las diferentes matrices biológicas se llevó a cabo mediante ICP-ORS-MS, una vez mineralizadas las muestras. La cuantificación se llevó a cabo en todos los casos por calibración interna, empleando rodio (Rh) como estándar interno a 100 ng g⁻¹. La recta de calibrado se preparó en un rango de concentraciones adecuado a partir de una disolución multielemental 2A, la cual contiene los analitos de interés.

La optimización de los diferentes parámetros del ICP-MS: posición de la antorcha, caudal del gas de nebulización, potencia de radiofrecuencia y voltaje de las lentes iónicas se realizó diariamente con una disolución comercial de 1 μ g L⁻¹ de Li, Y, Ce y

Tl. La tabla 5 muestra las condiciones operacionales de trabajo para los análisis multielemental.

Condiciones ICP-MS Agilent 7500ce	
Potencia	1500 W
Flujo gas de plasma	15 L min ⁻¹
Flujo gas auxiliar	1 L min ⁻¹
Flujo carrier gas	0.15 L min ⁻¹
Profundidad de muestreo	7mm
Conos de muestreo y skimmer	Ni
Flujo de He	4 mL min ⁻¹
Flujo de H ₂	3.5 mL min ⁻¹
Nebulizador	Micromist
Qoct	-18 V
Qp	-16 V
Tiempo de integración	0.3s por isótopo
Isótopos monitorizados	Usando He como gas de colisión: ⁵⁵ Mn, ⁵⁹ Co, ⁶³ Cu, ⁶⁶ Zn, ⁷⁵ As, ⁷⁸ Se, ¹⁰³ Rh, ¹¹⁴ Cd, ²⁰⁸ Pb.
	Usando H ₂ como gas de reacción: ⁸⁰ Se

Tabla 5. Condiciones operacionales óptimas para análisis multielemental por ICP-MS.

4.5. Procedimientos analíticos para especiación química

4.5.1. Preparación de muestras para especiación de arsénico

El procedimiento de extracción (García-Sevillano et al. 2013) de los arsenicales consta de los siguientes pasos: a 50 mg de tejido previamente pulverizados se le añaden 500µL de una mezcla metanol/agua(2:1, v/v) en un tubo Eppendorf seguido de agitación vigorosa durante 5 min en vortex. Entonces, se lleva a cabo la ruptura de las células con una sonda de ultrasonido (20 s a 4°C), seguido por una centrifugación a 4000rpm durante 10 min a 4°C para la separación de las fases. El sobrenadante y se transfiere a un tubo Eppendorf y se lleva a sequedad con corriente de nitrógeno y almacenamiento final a -80 °C hasta sus análisis. Por último, el extracto se reconstituye en 100µL de fase móvil, se agita, se centrifuga a 4000 rpm, at 4 °C durante 10 min, seguido de filtración con filtros de Iso-Disc poly (vinylidenedifluoride) para evitar la obstrucción de la columna. El método de extracción de arsenicales fue validado usando el material de referencia certificado TORT-2 (hepatopáncreas de

cangrejo), al que se aplica el mismo procedimiento de extracción descrito. Este material certifica la concentración total de arsénico, aunque algunos autores han publicado valores de especiación de arsénico en este material (Wahlen et al. 2004).

4.5.2. Análisis de especies de arsénico mediante AEC-ICP-MS

Las fracciones separadas que contienen arsénico se analizan mediante el acoplamiento de cromatografía de intercambio aniónico a espectrometría de masas elemental (AEC-ICP-MS). El acoplamiento AEC-ICP-ORS-MS se realiza conectando la salida de la columna cromatográfica a la entrada del nebulizador del ICP- MS por medio de un tubo PEEK de 20 cm (0.01 mm di). Las condiciones operacionales para el ICP-MS se describen en la sección 4.4.2, monitorizando solo el isótopo ⁷⁵As y usando helio como gas de colisión. Las condiciones operacionales para la detección por ICP-ORS-MS se resumen en la tabla 6.

Condiciones operacionales para el acoplamiento AEC-ICP-MS	
	Condiciones AEC
Columna	PRPX-100 (250 x 4,5 mm x 5µm)
Fase móvil	Fase A: 20 mM carbonato de amonio pH =8,5 Fase B: 100 mM carbonato de amonio pH =8,5
Gradiente	0 min : 100% A 2 min: 100% A 2,5 min: 100 %B 9,5 min: 100 %B 10 min: 100 %A 12 min: 100 %A
Flujo	1 mL min ⁻¹
Volumen de inyección	100 µL

Tabla 6. Condiciones cromatográficas optimizadas para la especiación de arsénico mediante AEC-ICP-MS.

4.6. Procedimientos analíticos para estudios metabólicos

La preparación de muestra para el análisis metabólico es diferente en función si se está trabajando con tejidos biológicos o fluidos:

4.6.1. Preparación de extractos de tejidos biológicos

La extracción de metabolitos en muestras de tejidos se realiza en dos etapas (García-Sevillano et al. 2013). Se emplean 30 mg de órgano previamente homogenizado que se mezclan con 300 μ L de metanol pre-enfriado con ácido fórmico al 0.1%, seguido de agitación con vortex durante 5 min. La extracción de metabolitos polares se realiza con la ayuda de un *pellet mixer*, y el extracto resultante se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. 50 μ L del sobrenadante, extracto polar, se transfiere a un tubo Eppendorf para su análisis por GC-MS, y el sobrenadante restante se transfiere a otro tubo Eppendorf para su análisis por DI-ESI-QqQ-TOF-MS. El precipitado resultante se vuelve a extraer para la separación de los metabolitos lipofílicos. Para ello, se adicionan 300 μ L de cloroformo-metanol (2:1 v/v) con ácido fórmico al 0.1% y formiato amónico 10 mM, y la mezcla se vuelve a homogeneizar y centrifugar bajo las mismas condiciones anteriores. El sobrenadante resultante se recoge obteniéndose el extracto apolar.

4.6.2. Preparación de extractos de suero

El tratamiento de muestras de suero para su estudio metabolómico consiste en una extracción secuencial en dos pasos (García-Sevillano et al. 2015a). Se adicionan 400 μ L de una mezcla metanol-etanol (1:1 v/v) a 100 μ L de suero para precipitar las proteínas, y a continuación la mezcla se agita durante 5 minutos y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. 50 μ L del sobrenadante, extracto polar, se transfieren a un tubo Eppendorf para su análisis por GC-MS, y el sobrenadante restante se transfiere a otro tubo Eppendorf para su análisis por DI-ESI-QqQ-TOF-MS. Ambos extractos polares se llevan a sequedad empleando un sistema de vacío SpeedVac. Por otro lado, el precipitado proteico obtenido en la primera etapa se vuelve a extraer con 400 μ L de una mezcla cloroformo-metanol (2:1 v/v) mediante agitación en un vortex durante 5 minutos, seguido por una centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante, extracto apolar, se lleva a sequedad con una corriente de N₂.

Los extractos polares obtenidos se reconstituyen en 100 μL de metanol-agua (80:20, v/v) con ácido fórmico al 0.1% para su análisis por QqQ-TOF; mientras que los extractos lipofílicos se reconstituyen en 100 μL de cloroformo-metanol (2:1, v/v) con formiato amónico 50 mM.

4.6.3. Análisis metabolómico mediante DI-ESI-QqQ-TOF-MS

Los análisis metabolómicos se llevaron a cabo por infusión directa a un espectrómetro de masas Q-TOF utilizando una fuente de ionización por electrospray. Tanto los extractos polares como los lipofílicos fueron analizados en modo de ionización positiva como negativa, adquiriéndose espectros de barrido completo durante 0.2 minutos en un rango de m/z 50-1100. Los parámetros experimentales optimizados para el sistema híbrido QqQ-TOF se muestran en la tabla 7.

Condiciones operacionales para el análisis de metabolitos por DI-ESI-QqQ-TOF-MS		
Flujo	5 $\mu\text{L min}^{-1}$	
Rango m/z	50-1100	
Curtain gas (N_2)	1.13 mL min^{-1}	
Gas nebulizador (N_2)	1.56 mL min^{-1}	
Temperatura de la fuente	60 $^{\circ}\text{C}$	
	Modo de adquisición	
	Positivo	Negativo
Voltaje de Ion spray (IS)	3300 V	-4000 V
Potencial declustering (DP)	60 V	-100 V
Potencial focusing (FP)	250 V	-250 V
Energía de impacto electrónico (IE)	2.0 V	-2.0 V
Canal electromultiplicador	2200 V	2200 V

Tabla 7. Condiciones operacionales para el estudio metabolómico por DI-ESI-QqQ-TOF-MS.

4.6.4. Análisis metabolómico mediante GC-MS

Para el análisis por GC-MS, los extractos polares de suero y tejidos, obtenidos con el procedimiento explicado en los apartados 4.6.1 y 4.6.2, se reconstituyeron con agentes derivatizantes (Begley et al. 2009). Para la protección de los grupos carbonilo por metoximación, se resuspenden los extractos en 50 μL de metoxiamina 20 ng mL^{-1} en piridina, y se incuban a 80 $^{\circ}$ C durante 15 minutos en un baño termostatzado.

Posteriormente, las moléculas se silanizan mediante adición de 50 μL de trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) e incubación a 80°C durante 15 min.

La separación cromatográfica se realizó en un cromatógrafo de gases UltraTrace acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de iones ITQ900, utilizando una columna VF-5MS con un tiempo total de análisis de 18 minutos. Las condiciones operacionales para los análisis metabólico por GC-MS se muestran en la tabla 8.

Condiciones operacionales para análisis de metabolitos por GC-MS	
Columna	Factor Four Capillary Column VF-5MS 30m x 0.25mm ID x 0.25 μm film thickness (Varian)
Flujo del carrier gas (He)	1mL min ⁻¹
Volumen de inyección	1 μL (Splitless)
Programa	100 °C durante 0.5 minutos 100°C to 320°C, 15°C min ⁻¹ 320°C durante 2.8 minutos
Temperatura del inyector	280°C
Temperatura de la fuente	200°C
Energía de impacto electrónico (EI)	70 eV
Rango de adquisición (m/z)	35-650

Tabla 8. Condiciones operacionales para el estudio metabólico por GC-MS.

4.6.5. Procesamiento de datos

Los datos obtenidos mediante las distintas plataformas metabólicas fueron procesados haciendo uso del software Markerview, para DI-ESI-QqQ-TOF-MS y XCMS, para GC-MS.

Los archivos del análisis por DI-ESI-QqQ-TOF-MS se exportaron en formato .wif desde el programa informático del equipo de trabajo. Los archivos fueron exportados al software Markerview™ (Applied Biosystems) con objeto de reducir el número de picos (m/z) a considerar e intensidades de menor importancia, para la creación de una matriz de datos bidimensionales (m/z vs intensidad). Además, los resultados fueron normalizados utilizando la suma total de área de cada variable para corregir posibles desviaciones instrumentales.

Para el procesamiento de datos tras el análisis de las muestras por GC-MS, los archivos obtenidos se convierten en formato netCDF mediante la herramienta de conversión de datos de Thermo Fisher Scientific. Los datos se procesan siguiendo el procedimiento descrito por Katajamaa y Oresic (Katajamaa y Oresic 2007), que consta de una serie de etapas, incluyendo la detección de variables, alineación de picos y normalización. Estos datos se procesaron mediante el método *matchedFilter*, que utiliza un algoritmo que divide los perfiles metabolómicos en diferentes cromatogramas de iones extraídos (XIC) empleando un ancho de m/z constante. Además, los parámetros de XCMS se optimizan para obtener la mayor información posible: el valor de S/N (señal/ruido) se fija 2, y se ajusta el ancho total a la mitad de la altura del pico (fwhm) a un valor de 3. Tras la búsqueda de picos, se realizan correcciones tanto en la agrupación de picos como en su alineación (tiempo de retención). Posteriormente, se normalizan los resultados mediante el método LOESS (Locally weighted scatterplot smoothing) el cual corrige la variabilidad intermuestral aproximando a cero las diferencias en la intensidad de los picos entre las distintas muestras. Por último, los datos se transforman logarítmicamente para estabilizar la variabilidad de los resultados, y se convierte en un archivo .csv para su posterior análisis estadístico.

4.6.6. Análisis estadístico de los resultados

La evaluación de los resultados en experimentos tan complejos (dónde el número de muestras y de variables es elevado) requiere el empleo de técnicas estadísticas multivariantes, ya que es difícil que solamente comparando los espectros obtenidos podamos diferenciar entre los grupos de estudio, por lo que se requiere el empleo de técnicas análisis estadísticos multivariantes. En este sentido, se utiliza el software SIMCAP™ (version 11.5, UMetrics AB, Umeå, Suecia) para llevar a cabo el análisis estadístico de los resultados obtenidos tras el análisis por DI-ESI-QqQ-TOF-MS y GC-MS. Dicho software permite realizar un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) con el fin de clasificar los grupos de estudio. Este procedimiento

estadístico permite realizar por un lado, representaciones de los *scores*, que muestran la variabilidad entre muestras, y por tanto separar los grupos de estudio; y por otro lado, representar los *loadings*, que muestran la variabilidad entre variables estableciendo la importancia relativa de las mismas en la separación de grupos. La validación del modelo se lleva a cabo mediante el valor de los parámetros R^2 y Q^2 , los cuales son indicativos de la separación de clases y el poder predictivo del modelo, respectivamente. Sus valores oscilan entre 0 y 1.

Finalmente, las variables (metabolitos) responsables de la discriminación pueden seleccionarse de acuerdo con el valor del parámetro VIP (*Variable Importance in the Projection*), el cual es una suma ponderada del cuadrado del peso de cada variable en el PLS, indicando la importancia de la variable en el modelo. Solamente los metabolitos con $VIP > 1$ fueron considerados como significativos.

Además, con objeto de validar los compuestos identificados mediante PLS-DA, se aplicó un análisis univariante a cada variable haciendo uso del software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

4.7. Procedimientos analíticos para estudios proteómicos

4.7.1. Preparación de muestras para estudios proteómicos

Las muestras tejidos biológicos de ratones *Mus musculus* se con el criohomogenizador modelo SPEX SamplePrep Freezer/ Mill 6770. Para la extracción de proteínas, los tejidos de hígado se homogeneizaron con un tampón que contenía 8 M urea, 0,1 M NH_4HCO_3 , 2 mM AEDT, 20 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 e inhibidor de proteasa y fosfato (1 mL /100 mg de tejido) (Shao et al. 2016). Las muestras se con una sonda modelo Branson SLPEoperando a una amplitud del 50% durante 2 minutos (10 segundos de trabajo/10 segundos apagado). Finalmente, los extractos obtenidos se centrifugan a 4000 g durante 5 min, y el sobrenadante obtenido se divide en alícuotas de 200 μL para su almacenamiento en tubos Eppendorf a -60°C hasta su análisis.

La digestión de proteínas se lleva a cabo siguiendo el método descrito por J.E Araújo et al. (Araújo et al. 2014). 50 μL del sobrenadante obtenido en la etapa previa, que contiene las proteínas extraídas, se ultrafiltran con una membrana de 10 kDa para eliminar el tampón de extracción, y se centrifuga a 14000 g durante 20 min a 18°C. La membrana de ultrafiltración se lava con 200 μL de urea 8 M en Ambic 25 mM y se centrifuga a 14000 g durante 20 min. Para la digestión de proteínas, se agregan 200 μL de DTT 50 mM y las muestras se incuban durante 60 min a 37°C y se centrifugan a 14000 g durante 20 min. Posteriormente, las proteínas se alquilan añadiendo 100 μL de IAA 50 mM e incubando a temperatura ambiente, durante 45 min en oscuridad, centrifugando bajo las mismas condiciones una vez transcurrido dicho tiempo. Después de la reducción y la alquilación, se adicionan 100 μL de una solución de tripsina en Ambic 12.5 mM a las muestras para llevar a cabo la digestión, manteniendo una relación proteína: enzima de 1:30. La digestión con tripsina se lleva a cabo a 37°C durante la noche. Finalmente, las muestras se llevan a sequedad mediante un sistema SpeedVac y se almacenan hasta su análisis.

4.7.2. Análisis proteómico mediante nanoLC-ESI-TOF-MS/MS

Las muestras peptídicas obtenidas en la sección anterior, fueron resuspendidas en 100 μL de acetonitrilo al 3% (v/v) con 0,1% (v/v) FA. Las muestras se homogeneizan durante 5 minutos en vortex y se sonicán en un baño de ultrasonido durante 10 minutos. Posteriormente, en 3 μL de esta mezcla conteniendo 750 ng de péptidos, se elimina la presencia de sales utilizando una columna Acclaim PepMap100, 5 μm , 100 Å, 300 μm id \times 5 mm, pasando una fase móvil que contiene de 3% a 5% de B (B: 90% de acetonitrilo con 0.08% FA con un flujo de 15 $\mu\text{L min}^{-1}$). Posteriormente, los péptidos se separan con una columna analítica C18 (Acclaim™ PepMap™ 100 C18, 2 μm , 0.075 mm id \times 150 mm) utilizando un gradiente lineal de 300 nL min^{-1} , con el siguiente gradiente de fase móvil: (a) fase móvil A, acuosa con 0,1% FA (v/v); (b) fase móvil B, con 90% (v/v) de acetonitrilo y 0,08% FA (v/v), desde 5% a 35% de la fase móvil B de 5-90 min, y un gradiente lineal desde 35% a 95% de fase móvil B de 90-

100 min, y por último 95% B de 100-110min. La separación cromatográfica se realizó a 35°C. La adquisición de MS se estableció en ciclos de MS (2 Hz), seguido de MS/MS (8–32Hz), tiempo de ciclo de 3,0 segundos. Todos los espectros se adquirieron en el rango de 150 a 2200 m/z.

Los datos de LC-MS/MS se analizan utilizando el software MaxQuant versión 1.6.0.16. Las búsquedas en la base de datos se realizan utilizando el motor de búsqueda Andrómeda con la base de datos UniProt-SwissProt *MusMusculus* como referencia y una base de datos de contaminantes comunes (Cox et al. 2011; Tyanova et al. 2016).

4.8. Referencias

Araújo JE, Oliveira E, Otero-Glez A, Santos Nores J, Igrejas G, Lodeiro C, Capelo JL, Santos HM (2014) A comprehensive factorial design study of variables affecting protein extraction from formalin-fixed kidney tissue samples. *Talanta* 119:90–97 . doi: 10.1016/j.talanta.2013.10.019

Begley P, Francis-McIntyre S, Dunn WB, Broadhurst DI, Halsall A, Tseng A, Knowles J, Goodacre R, Kell DB (2009) Development and performance of a gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry analysis for large-scale nontargeted metabolomic studies of human serum. *Anal Chem* 81: . doi: 10.1021/ac9011599

Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen J V., Mann M (2011) Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res* 10:1794–1805 . doi: 10.1021/pr101065j

García-Sevillano MA, Abril N, Fernández-Cisnal R, García-Barrera T, Pueyo C, López-Barea J, Gómez-Ariza JL (2015a) Functional genomics and metabolomics reveal the toxicological effects of cadmium in *Mus musculus* mice. *Metabolomics*. doi: 10.1007/s11306-015-0801-z

García-Sevillano MA, García-Barrera T, Navarro F, Gailer J, Gómez-Ariza JL (2014) Use

of elemental and molecular-mass spectrometry to assess the toxicological effects of inorganic mercury in the mouse *Mus musculus*. *Anal Bioanal Chem* 406:5853–65 . doi: 10.1007/s00216-014-8010-6

García-Sevillano MA, García-Barrera T, Navarro F, Gómez-Ariza JL (2013) Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As₂O₃ based on integrated -omics approaches. *Metallomics* 5:1644–55 . doi: 10.1039/c3mt00186e

García-Sevillano MA, Rodríguez-Moro G, García-Barrera T, Navarro F, Gómez-Ariza JL (2015b) Biological interactions between mercury and selenium in distribution and detoxification processes in mice under controlled exposure. Effects on selenoprotein. *Chem Biol Interact* 229:82–90 . doi: 10.1016/j.cbi.2015.02.001

Gómez-Parra A, Forja JM, DelValls TA, Sáenz I, Riba I (2000) Early contamination by heavy metals of the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar mining spill (SW Spain). *Mar Pollut Bull* 40:1115–1123 . doi: 10.1016/S0025-326X(00)00065-5

Katajamaa M, Oresic M (2007) Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J Chromatogr A* 1158:318–28 . doi: 10.1016/j.chroma.2007.04.021

Kennish MJ (2002) Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environ Conserv* 29: . doi: 10.1017/S0376892902000061

Mendiguchía C, Moreno C, García-Vargas M (2007) Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients. *Chemosphere* 69:1509–1517 . doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.05.082

Morales-Prieto N, Ruiz-Laguna J, Abril N (2018) Dietary Se supplementation partially restores the REDOX proteomic map of *M. spretus* liver exposed to p,p'-DDE. *Food Chem Toxicol* 114:292–301 . doi: 10.1016/j.fct.2018.02.047

Pasha ST (1981) Changes in hepatic microsomal enzymes due to DDT, DDE and DDD feeding in CF-1 mice. *Indian J Med Res* 74:926–930

Sadiq M (1992) Toxic Metal Chemistry in Marine Environments. In: Arsenic in Marine Environment. pp 61–105

Sáenz I, Riba I, Forja JM, DelValls TA, Gómez-Parra A (2003) Acumulación y fraccionamiento geoquímico de metales pesados en sedimentos del estuario del Guadalquivir. In: Sáenz I, Riba I, Forja JM, DelValls TA, Gómez-Parra A (eds) Contaminación por metales pesados del estuario del Guadalquivir. Efecto del accidente minero de Aznalcóllar sobre el medio físico y los organismos marinos. Servicio de publicaciones de la Universidad de Cádiz, pp 71–104

Shao S, Guo T, Gross V, Lazarev A, Koh CC, Gillessen S, Joerger M, Jochum W, Aebbersold R (2016) Reproducible tissue homogenization and protein extraction for quantitative proteomics using micropestle-assisted pressure-cycling technology. *J Proteome Res* 15:1821–1829 . doi: 10.1021/acs.jproteome.5b01136

Tornero V, Arias AM, Blasco J (2011) Following the Aznalcóllar toxic spill. *Environ Res* 111:1033–1036 . doi: 10.1016/j.envres.2011.07.011

Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13:731–740 . doi: 10.1038/nmeth.3901

Wahlen R, McSheehy S, Scriver C, Mester Z (2004) Arsenic speciation in marine certified reference materials. *J Anal At Spectrom* 19:876 . doi: 10.1039/b402482f

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Results and discussion



Resultados y discusión

Los artículos del apartado “Resultados y discusión” han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a derechos de autor. En sustitución de los artículos ofrecemos la siguiente información: referencia bibliográfica, enlace a la revista y resumen, en caso de estar publicado el artículo.

- Rodríguez Moro, G., García Barrera, T., Trombini, Ch., Blasco, J., Gómez Ariza, J.L.: “Combination of HPLC with organic and inorganic mass spectrometry to study the metabolic response of the clam *Scrobicularia plana* to arsenic exposure”. *Electrophoresis*. Vol. 39, n. 4, págs. 635–644, (2017). DOI: /10.1002/elps.201700318

Enlace al texto completo del artículo: <https://doi.org/10.1002/elps.201700318>

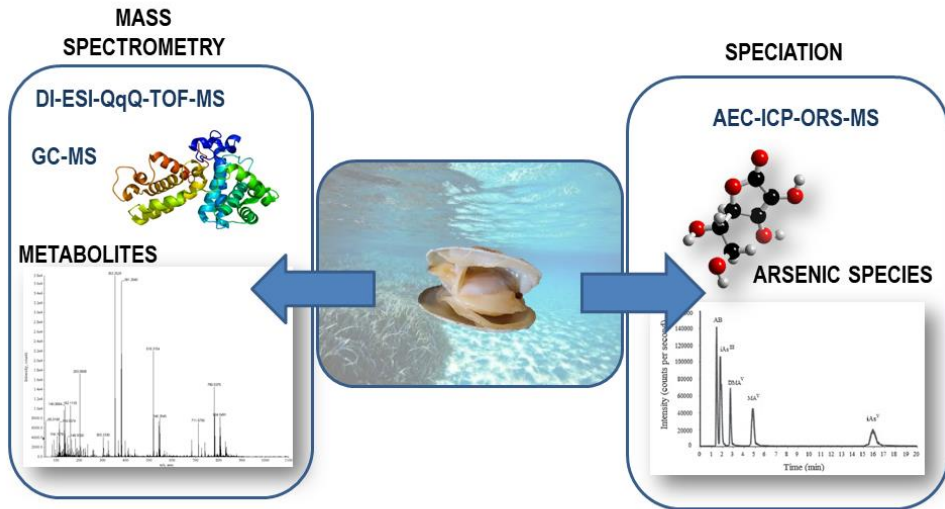
RESUMEN:

Arsenic is a toxic element extensively studied in the marine environment due to differential toxicological effects of inorganic and organic species. In the present work, the bivalve *Scrobicularia plana* was exposed to AsV (10 and 100 µg/L) for 14 days to evaluate the metabolic perturbations caused by this element. Arsenic speciation and metabolomic analysis were performed in the digestive gland of the bivalve using two complementary analytical platforms based on inorganic and organic mass spectrometry. It has been observed the greater presence of the innocuous specie arsenobetaine produced in this organism as defense mechanism against arsenic toxicity, although significant concentrations of methylated and inorganic arsenic were also present, depending on the level of arsenic in aqueous media. Complementarily, a metabolomic study based on mass spectrometry and statistical discriminant analysis allows a good classification of samples associated to low and high As(V) exposure in relation to controls. About 15 metabolites suffer significant changes of expression by the presence of As(V): amino acids, nucleotides, energy-related metabolites, free fatty acids, phospholipids and triacylglycerides, which can be related to membrane structural and functional damage. In addition, perturbation of the methylation cycle, associated with the increase of homocysteine and methionine was observed, which enhance the methylation of toxic inorganic arsenic to less toxic dimethylarsenic.

- Rodríguez Moro, G., García Barrera, T., Trombini, Ch., Blasco, J., Gómez Ariza, J.L.: “Metabolomic study of *Scrobicularia plana* based on organic mass spectrometry for environmental stress assessment”. *Marine Pollution Bulletin*, submitted.

- Rodríguez Moro, G., Navarro, F., Baya Arenas, R., Arias Borrego, A., Callejón Leblic, B., Gómez Ariza, J.J., García Barrera, T.: "Metabolic impairments, metals traffic and dyshomeostasis caused by the antagonistic interaction of cadmium and selenium using organic and inorganic mass spectrometry". Environmental Science and Pollution Research, submitted.

- Rodríguez Moro, G., Abril, N., Jara Biedma, R., Ramírez Acosta, S., Gómez Ariza, J.J., García Barrera, T.: "Metabolic impairments caused by "chemical cocktails" in mammals using direct infusion triple quadrupole time of flight and gas chromatography mass spectrometry". Chemical Research in Toxicology, submitted.



CAPÍTULO 1

CHAPTER 1

“Estudio de la respuesta biológica del molusco bivalvo *Scrobicularia plana* utilizando un enfoque metalo-metabolómico”

"Study of the biological response of the bivalve mollusk *Scrobicularia plana* using a metalo-metabolomic approach"

1.1 Combination of HPLC with organic and inorganic mass spectrometry to study the metabolic response of the clam *Scrobicularia plana* to arsenic exposure.

G. Rodríguez-Moro, T. García-Barrera, Ch. Trombini, J. Blasco and J.L. Gómez-Ariza

Electrophoresis 2018, 39, 635–644.

1.2 Metabolomic study of *Scrobicularia plana* based on organic mass spectrometry for environmental stress assessment.

G. Rodríguez-Moro, T. García-Barrera, Ch. Trombini, J. Blasco and J.L. Gómez-Ariza

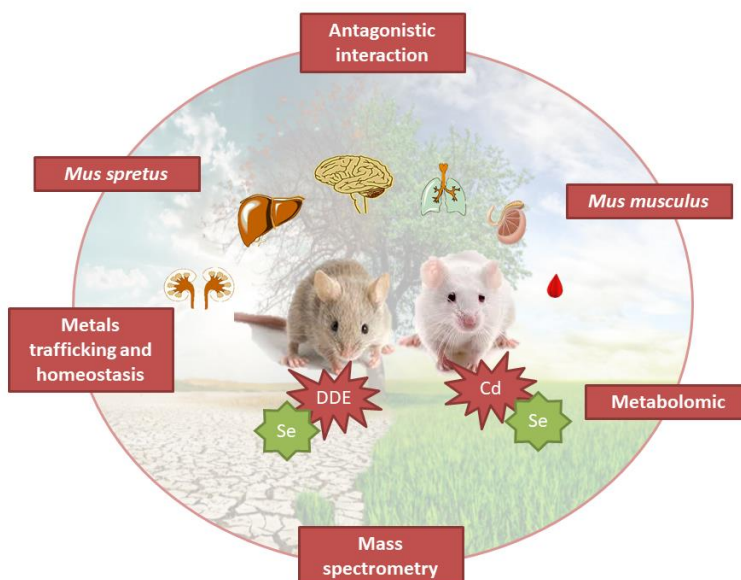
Marine Pollution Bulletin, submitted

The problem of environmental pollution in aquatic ecosystems due to anthropogenic activities has provoked a great interest in recent years about the study and use of biomarkers, which are biological parameters, measured in organisms bioindicators, which indicate, by altering their biomarkers levels, the exposure to these pollutants, their biological effects or the risks of their presence in ecosystems. For this reason, the omics are now the new tool to assess the global biological response to pollution, in particular the presence and modifications suffered by metallobiomolecules and the metabolites, used as biomarkers of environmental stress. The new analytical technologies for the study of biological response, in particular the use of speciation based on HPLC-ICP-MS and fast and effective extraction techniques of species together with tandem mass techniques (Q-TOF), are opening new possibilities in the study and characterization of metallobiomolecules and metabolites.

In this sense, aquatic invertebrates are very good bioindicators that result particularly useful for assessing the quality of aquatic ecosystems; the species indicators must joint a number of characteristics such as wide geographical distribution and great abundance, in addition they have to present a relationship between the content of contaminants in their tissues and the concentration of them in the environment, as already mentioned in the introduction of this Doctoral Thesis. On the other hand, they have to be suitable for studies in the laboratory. These organisms have been used in numerous research works, considering their accumulation capacity of pollutants and to explore the changes produced in their metabolic pathways due to exposure to xenobiotics, such as metals, organic contaminants and drugs. For this purpose the bivalve *Scrobicularia plana* was selected in this chapter to evaluate the biological response to the contamination using a metallo-metabolomic approach. In this sense, the arsenic toxicological effects under the double focus of inorganic and organic species were considered. The bivalve *Scrobicularia plana* was exposed to As^V (10 and 100 µg·L⁻¹) for 14 days to evaluate the metabolic perturbations caused by this element. Arsenic speciation and metabolomic analysis were performed in the digestive gland of the bivalve using two complementary analytical platforms based on

inorganic and organic mass spectrometry. It has been observed the greater presence of innocuous arsenobetaine produced as defense mechanism against arsenic toxicity, although significant concentrations of methylated and inorganic arsenic were also present, depending on the level of arsenic in aqueous media. Complementarily, a metabolomic study based on mass spectrometry and statistical discriminant analysis allows a good classification of samples associated to low and high As(V) exposure in relation to controls. About 15 metabolites suffer significant changes of expression by the presence of As(V): amino acids, nucleotides, energy-related metabolites, free fatty acids, phospholipids and triacylglycerides, which can be related to membrane structural and functional damage. In addition, perturbation of methylation cycle, associated with the increase of homocysteine and methionine was observed, which enhance the methylation of toxic inorganic arsenic to less toxic dimethylarsenic.

In addition, the present chapter focuses on the evaluation and monitoring of the pollution of the southwest of the Iberian Peninsula, the Guadalquivir River estuary, using as bioindicator the molluscs *Scrobicularia plana*. In this study, a metabolomic approach based on the combined use of two organic mass spectrometry techniques, which combine direct infusion mass spectrometry (DI-ESI-QqQ-TOF MS) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) has been developed in the disgestion gland to characterize the interactions of this organism with their environment and the pollutants present in it. For this, the metabolic response of its digestive gland, which is the most metabolically active organ of this clam, has been used to compare areas subjected to different pollution levels. Statistic analysis of results using multivariate techniques show a good classification between the studied groups caused by about 30 altered metabolites, including energy metabolism, degradation of membrane phospholipids, β -oxidation and oxidative stress, that confirm the potential of combined metabolomic platforms in environmental studies.



CAPÍTULO 2

CHAPTER 2

“Combinación de metodologías -ómicas para evaluar la respuesta biológica del ratón de laboratorio *Mus Musculus* y de vida libre *Mus spretus* sometidos a exposiciones controladas de elementos tóxicos. Efecto antagonista del selenio”

"Combination of -omics methodologies to evaluate the biological response of the *Mus Musculus* and *Mus spretus* mice after controlled exposure of toxic elements based on the use of -omic" technologies. Antagonistic interaction with selenium”

2.1. Metabolic impairments, metals traffic and dyshomeostasis caused by the antagonistic interaction of cadmium and selenium using organic and inorganic mass spectrometry.

G. Rodríguez-Moro, F. Navarro, R. Baya-Arenas, A. Arias-Borrego, B. Callejón-Leblic, J.L. Gómez-Ariza and T. García-Barrera

Environmental Science and Pollution Research, submitted.

2.2. Metabolic impairments caused by “chemical cocktails” in mammals using direct infusion triple quadrupole time of flight and gas chromatography mass spectrometry.

G. Rodríguez-Moro, N. Abril, R. Jara-Biedma, S. Ramírez-Acosta, J.L. Gómez-Ariza and T. García-Barrera.

Chemical Research in Toxicology, submitted.

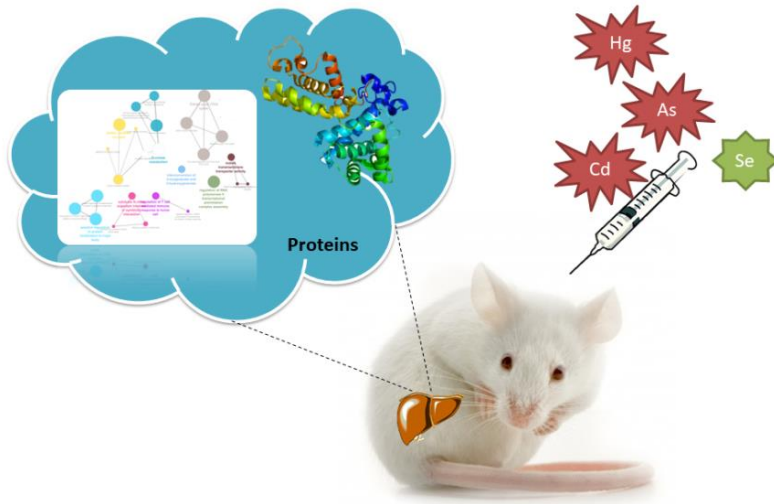
Metals play an important role in the development and function of organisms since the behavior of many genes, transcripts, proteins, metalloproteins and metabolites depends on the concentration of them in the organism. The interest to monitoring the effects of heavy metals on living organisms has increased as a result of natural changes and anthropogenic activities that have led to an increase in the levels of toxic metals in terrestrial and aquatic ecosystems, including metals such as arsenic, cadmium and mercury, mainly; or organic compounds, for example pesticides. In this sense, modern analytical technologies are providing new tools to investigate in depth the toxicity of metals, and to better understand the interactions between metals and organisms.

In addition, as discussed previously in the introduction, the metabolism of trace elements should not be considered in isolation since living organisms are exposed to a complex environment in which numerous different chemical elements coexist and their species that can interact with each other. For all this, in this chapter we study the interaction of Cd and DDE with Se, through the use of omic techniques that allow us to know in depth the mechanism of action of these toxic compounds and the possible antagonistic role of selenium.

Cadmium has become one of the most important environmental pollutants in the world, derived from natural and industrial sources, which is known to be accumulated in the human body, producing serious health effects. On the other hand, selenium is an essential element for mammals, which is well known for its antagonistic interaction against cadmium toxicity, such as the prevention of oxidative stress induced by this element. For this reason, the use of complementary analytical methods to study the homeostasis of metals, the knowledge of “traffic” between different organs and massive information about metabolites altered by the exposure is of great interest. To this end, a metabolomic workflow based on the use of direct infusion mass spectrometry (DIMS) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) was applied to mice serum. This work, demonstrate for the first time that Cd exposure causes a decrease of all the elements studied in lung except itself. On the other hand,

Se provokes As trafficking from metabolically less active organs (brain, lung and testes) to others with greater metabolic activity (kidney), which also facilitates its excretion. Moreover, when mice are only exposed to Se, this element provokes the accumulation of almost all the elements in kidney, except Cd that increases also in liver and brain. However, when both elements are simultaneously administered, Se increases Cd concentration in all the organs except in serum and especially in testis. On the other hand, important metabolic alterations have been detected in the energy and amino acid metabolism, as well as degradation of phospholipidic membranes, and in free fatty acids.

Among the organic contaminants, pesticides are one of the most important groups of chemicals due to their persistent character and toxicity. In this paper, the metabolic impairments caused by the join exposure of *p,p'*-dichloro diphenyl trichloroethane (DDE) and selenium (Se) have been issued for the first time. A metabolome workflow was applied to mice fed supplemented diet with DDE and DDE plus Se, on the basis of the complementary use of two organic mass spectrometric techniques, combining direct infusion mass spectrometry (DI-ESI-QqQ-TOF MS) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). The results show a good classification between the studied groups caused by about 70 altered metabolites in liver, kidney or brain, including the pathways of energy metabolism, degradation of phospholipidic membrane, β -oxidation and oxidative stress, which confirm the potential of combined metabolomic platforms in environmental studies.



CAPÍTULO 3

CHAPTER 3

“Estudio proteómico de la respuesta biológica del ratón de laboratorio *Mus musculus* bajo exposición a metales y su interacción antagonista con selenio”

“Proteomic signatures in the biological response of *Mus musculus* mice against metals exposure and the antagonistic interaction with selenium”

Metals have a central role in biological systems, regulating numerous cellular processes and alternatively, having toxic or deleterious effects on the proteins, considered as the main components of metabolic pathways. Hence, the study of metal-induced changes in cellular metabolic pathways is crucial to understand the biological response associated with environmental issues. However, the organisms are usually exposed to several metals from the environment where they live and numerous antagonistic or synergistic interactions take place. Arsenic (As), Cadmium (Cd) and Mercury (Hg) are toxic metals of environmental significance with harmful effects for humans, but under our knowledge, their joint effect has not been evaluated in mammals previously. On the other hand, it is well known that selenium (Se) presents antagonistic interactions with numerous elements. In the present work, *Mus musculus* mice were exposed over a period of 10 days to the action of toxic metals: As, in the form of NaAsO_2 ; Cd, in the form of CdCl_2 ; and Hg as HgCl_2 . To this end, a proteomic study was carried out in liver which is considered as the most metabolically active organ. These samples were subjected to a previous extraction and tryptic digestion and were subsequently analyzed by mass spectrometry using nanoLC-ESI-TOF-MS/MS to determine altered protein expression levels of *Mus musculus* against metal contamination and to deep insight into the mode of action of these pollutants. The results show many deregulated proteins between the different groups studied. The modified pathways by the differentially expressed proteins were analyzed using Cytoscape. The Cytoscape analysis showed the alteration of important metabolic routes. The application of this technologies for environmental proteomics hold a great potential to get deeper insight into the response of living organisms to pollution.

Proteomic signatures in the biological response of *Mus musculus* mice against metals and the antagonistic interaction with selenium

1. Introduction

Chemical elements are naturally found in the environment, and they can have toxic or beneficial character on living organisms (Goyer 2001; García-Sevillano et al. 2012). Some metals, such as the transition metals, Cu, Zn, Mn, Fe or Se, play important roles in the evolution and growth of organisms since the mode of actions of many genes, transcripts, proteins, metalloproteins and metabolites depends critically on their interaction with metals present in the cell (Barbosa 2017). It is important to consider that approximately one third of proteins need the presence of metals as cofactors to develop their function (metalloproteins) and that metals influence on more than 50% of the proteins (Mounicou et al. 2009). These metals are responsible of catalytic properties or structure of proteins and the presence in molecules is determined in many cases by the genome (Tainer et al. 1991). Nevertheless, other elements such as arsenic (As), cadmium (Cd), lead (Pb), and mercury (Hg) are non-essential with unknown roles in human physiology and may be present in concentrations that disrupt normal biological functions inducing cellular stress responses (Pollack et al. 2015; Barbosa 2017). Mammals such mice are exposed to metals through different exposure routes such as oral, dermal, inhalation or subcutaneous, but finally they get to the bloodstream, where different proteins act as transporters carrying these metals to different organs of the body, through different metal-biomolecule unions necessary for the biological functions (García-Sevillano et al. 2014c). However, this scheme can be altered by the presence of toxic metals or contaminants, causing serious problems in organisms even death (Gómez-Ariza et al. 2011).

In this sense, traditional chemical analysis are based on the determination of the presence of these contaminants in the environment, but not providing information on the biological response or toxic impacts against living organisms. For this purpose, it is

necessary the use of analytical techniques to detect early warning signals (biomarkers) using model organisms to evaluate their adverse effects (García-Sevillano et al. 2014a).

The use of free living mammals as bioindicators to study the biological response against metals, used as biomarkers of environmental pollution has been issued in several studies (García-Sevillano et al. 2012; García-Sevillano et al. 2015b). Although the study of free-living organisms is cheap and easy, is difficult to establish a direct connection between the biological response and the pollutant since it can be easily influenced by other pollutants or variables (García-Barrera et al. 2018). To this end, model organisms exposed to pollutants in controlled exposure experiments have also been performed (Hodson 2002; García-Sevillano et al. 2013). Moreover, the use of free-living animal is crucial to validate the results obtained with free-living organisms (Gonzalez-Fernández et al. 2011). On the other, hand most of these studies focus on only one element or a very well-defined species family associated with an element, and some elements (or species of them) can interact with the actions of others through synergistic and antagonistic mechanisms, making necessary the study of the biological response against “chemical cocktails” (García-Sevillano et al. 2014d; García-Sevillano et al. 2014c; García-Sevillano et al. 2015c).

In the last decades, the use of methodologies of massive analysis, the omics (i.e. genomics, proteomics, metabolomics and ionomics), are considered useful tools to characterize the biological response to environmental pollution (García-Sevillano et al. 2014a). Environmental proteomics, provides a global evaluation of toxic and defensive mechanisms induced by pollutants through the identification of proteins that are significantly altered after exposure experiments, revealing the toxic mechanisms and allowing the discovery of potential biomarkers for environmental biomonitoring (Sanchez et al. 2011).

In this context, mass spectrometry (MS) plays an essential role as an analytical technique for the identification of proteins. The coupling with chromatography

techniques, such Liquid Chromatography (LC-MS) provides high sensitivity and allows identifying thousands of proteins even at small concentrations (Gao et al. 2012). The MaxQuant suite is a set of algorithms, which includes peak detection and scoring of peptides, which performs mass calibration and database searches for protein identification and quantification (Cox et al. 2009).

The aim of the present study was to characterize the biological response of the laboratory mice *Mus musculus* exposed to a chemical cocktail of metals and selenium, to evaluate the antagonistic interactions. For this purpose, mice were exposed to As, Cd and Hg and selenium for 10 days. A proteomic approach based on the use of LC-ESI-MS/MS has been applied to determinate the the level of differential proteins in liver which is the organ with a higher metabolically activity and know the modified the biological pathways under the actions of this metals.

2. Materials and methods

2.1 Animals and experiment exposure

Mus musculus (inbred BALB/c strain) mice were obtained from Charles River Laboratory (Spain). Mice of 7 weeks of age were fed ad libitum with conventional pellets (rodent global diet from Harlan Laboratories Inc. Indianapolis, IN 46250, USA). The animals were allowed to acclimate for 5 days with free access to food and water under controlled conditions (temperature (25–30 °C) and a 12 h light–dark cycle) prior to exposure.

Mice were randomly divided into four groups (5 mice in each group): one *control* and three treated groups as follows: *Se* group, *Metals* group and *Metals+Se* group. Arsenic (As_2O_3), cadmium (CdCl_2), mercury (HgCl_2) and selenium (Na_2SeO_3) were orally administrated by using an oral gavage for mice at different doses for 10 days. The *control* group was treated with 100 μL of 0.9% NaCl. The *Se* group was exposed to a supplemented dose of selenite, fixed at 0.50 mg/kg bw/day. The third group, (*Metals*)

was daily administrated with 100 µl of a metals cocktail containing 0.1 mg/Kg bw CdCl₂ + 0.2 mg/Kg bw HgCl₂ + 3 mg/Kg bw As₂O₃. Finally, the fourth group was exposed to the same doses of metals (0.1 mg/Kg bw/day CdCl₂ + 0.2 mg/Kg bw/day HgCl₂ + 3 mg/Kg bw/day As₂O₃) and a supplemented dose of selenium (0.50 mg/kg bw/day). The acute orally doses of metals, arsenic, cadmium and mercury were selected taking into account the LD50 for mice which was not exceed the LD50 for the overall exposure experiment (10 days). On the other hand, selenium supplements of 0.50 mg/kg bw/day of selenite were calculated as 3 times more the recommended level of dietary selenium (García-Sevillano et al. 2015c; Morales-Prieto et al. 2018).

After 10 days, mice were individually anesthetized by isoflurane inhalation and exsanguinated by cardiac puncture, dissected using a ceramic scalpel and finally organs of interest were transferred rapidly to dry ice.

Individual organs were excised, weighed in Eppendorf vials, cleaned with 0.9% NaCl solution, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until they were used for analysis. Serum was obtained by centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C) of whole blood after incubation during 30 min at 37 °C in the dark. All animals received humane care in compliance with the guidelines of the animal care and use of the European Community. The investigation was performed after approval by the Ethical Committee of the University of Córdoba (Spain).

2.2 Reagents

All reagents used for sample preparation were of highest purity available. Arsenic trioxide (99.99 %, trace metals basis), cadmium chloride (99.99 %, trace metals basis), mercury chloride (99.99 %, trace metals basis) and sodium selenite (99%) used to prepare acute doses for oral administrations were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

All reagents used for proteomic analysis were HPLC grade or electrophoresis grade. Bovine serum albumin (BSA), Bradford reagent, DL dithiothreitol (DTT), iodoacetamide

(IAA), acetonitrile (ACN) and urea were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ammonium bicarbonate (Ambic) and formic acid were purchased from Fluka (Steinheim, Germany). Pierce™ Trypsin protease from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) was used for digestion.

2.3 Apparatus

Protein digestion was done in safe-lock tubes of 0.5 mL purchased from Eppendorf (Hamburg, Germany). A vacuum concentrator centrifuge model UNIVAPO 150 ECH Speed Vac and a vacuum pump model UNIJET II (Munich, Germany) were used for sample drying and sample pre-concentration. A mini incubator from Labnet (New Jersey, USA) was used for protein reduction and alkylation. A Centrifuge model MPW-350 from MPW Med. Instruments (Warsaw, Poland) and a vortex model ELMI CM70-09 sky line (Southern California, USA) were used for the sample treatment. A Microplate reader LT-4000 equipped with 595 nm filters from Labtech (Uckfield, UK) was used for Bradford protein assays. Protein identification was done in UHR-QqTOF IMPACT HD from Bruker Daltonics (Bremen, Germany). Chromatographic separation of peptides were carried out using an Ultimate 3000 nLC nano-system equipped with a trap-column Acclaim PepMap100, 5 µm, 100 Å, 300 µm i.d. × 5 mm (Thermo Fisher Scientific) and an analytical column Acclaim™ PepMap™ 100 C18, 2µm, 0.075mm i.d x 150mm (Thermo Fisher Scientific).

2.4 Experimental procedures for protein identification

2.4.1 Protein extraction

The liver samples were homogenized with a cryogenic homogenizer SPEX SamplePrep (Freezer/Mills 6770).

For protein extraction, liver tissues were homogenized with a buffer containing 8 M urea, 0.1 M NH_4HCO_3 , protease and phosphate inhibitor, 2 mM AEDT, 20 mM NaF, 1 Mm Na_3VO_4 . For this purpose, 1ml of this buffer was added to 100mg of tissue

(Reproducible Tissue Homogenization and Protein Extraction for Quantitative Proteomics Using MicroPestle-Assisted Pressure-Cycling Technology). Then, the sonication of samples was carried out with an ultrasonic sonotrode Branson SLPE (100W, 40 kHz; sonotrode diameter: 1 mm) operating at 50% amplitude during 2 minutes (10 seconds on/ 10 seconds off). Finally, the obtained extracts were centrifuged at 4000g during 5 min, and the supernatant were divided in aliquots of 200 μ L and stored in 0.5 mL safe-lock tubes at -60°C until further use.

2.4.2 96-well plate Bradford protein assay

Protein concentration was determined using Bradford method Abs 595 nm. Liver samples of different studied groups were quantified following the Bradford protein assay. Briefly, a BSA standard curve was prepared in the following concentrations (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). To each well being used, 200 μL of each standard at the right concentration were mixed with 250 μL Bradford reagent. The unknown samples were diluted with water and then 5 μL of each unknown were mixed with 250 μL Bradford reagent. Finally, the samples were incubated at room temperature for 20 min, and then absorbances were measured at 595 nm. The mean of protein concentration was $18.1 \pm 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

2.4.3 In solution protein digestion

In-solution digestion from liver samples was performed following the method proposed by J.E Araújo et al. (Araújo et al. 2014) with minor modifications. Briefly, samples were diluted with 8M urea in 25 mM Ambic to a final protein concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. 50 μL of the solution containing the extracted proteins was ultra-filtrated with a 10kDa cut-off membrane to remove the extraction buffer, centrifugation at 14000g during 20min at 18°C . The ultra-filtration membrane was washed with 200 μL of 8 M urea in 25 mM Ambic and it was centrifugated at 14000g for 20min. Then, it was added 200 μL of DTT 50 mM and the samples were incubated for 60 min at 37°C and it was centrifuged at 14000g for 20min and next it was added 200 μL Ambic and centrifugated under the

same conditions. Then protein alkylation was carried out by the addition of 100 μL of IAA 50 mM and incubated at room temperature protected from light for 45min and it was added 200 μL Ambic and centrifugated under the same conditions. After reduction and alkylation, the samples were then added 100 μL of a trypsin solution in Ambic 12.5mM to obtain a protein:enzyme ratio of 1:30. Trypsin digestion was carried out at 37°C overnight. Samples were evaporated to dryness, and previous to nanoLC-MS analysis, samples were resuspended in 100 μL of 3% (v/v) acetonitrile 0.1% (v/v) FA.

2.5 Nano LC-MS method

Peptides were resuspended in 100 μL of 3% (v/v) acetonitrile containing 0.1% (v/v) aqueous formic acid (FA). Then, samples were homogenized by 5 minutes on vortex followed by 10 minutes on an ultrasonic bath at 100% ultrasonic amplitude. Afterwards, samples were quantified using a pierce™ quantitative colorimetric peptide assay. After, 3 μL containing 750 ng of peptides were loaded onto a trap column (Acclaim PepMap100, 5 μm , 100 Å, 300 μm i.d. \times 5 mm) and desalted for 5 min from 3% to 5% B (B: 90% acetonitrile 0.08% FA) at a flow rate of 15 $\mu\text{L min}^{-1}$. Then the peptides were separated using an analytical column (Acclaim™ PepMap™ 100 C18, 2 μm , 0.075 mm i.d \times 150 mm) with a linear gradient at 300 nL min^{-1} (mobile phase A: aqueous FA 0.1% (vol/vol); mobile phase B 90% (vol/vol) acetonitrile and 0.08% (vol/vol) FA) 5-90 min from 5% to 35% of mobile phase B, 90-100 min linear gradient from 35% to 95% of mobile phase B, 100-110 95% B. Chromatographic separation was carried out at 35 °C. MS acquisition was set to cycles of MS (2 Hz), followed by MS/MS (8–32Hz), cycle time 3.0 seconds, active exclusion, exclude after one spectrum, release after 0.5 min. Reconsider precursor if current intensity, previous intensity 3.0 an intensity threshold for fragmentation of 2500 counts. All spectra were acquired in the range 150–2200 m/z.

2.6 Protein Identification and Quantification Method

LC-MS/MS data were analyzed using Data Analysis 4.2 software (Bruker). Proteins were identified using Mascot (Matrix Science, UK). MS/MS spectra were searched against the SwissProt database S_Prot MusMusculus (515,203 sequences; 181,334,896 residues). Tandem MS data were searched with MASCOT search engine with the following parameters: precursor mass tolerance of 20 ppm, fragment tolerance of 0.05 Da, trypsin specificity with a maximum of 2 missed cleavages, cysteine carbamidomethylation set as fixed modification and methionine oxidation, as variable modification. False discovery rate (FDR) was estimated by running the searches against a randomized decoy database. Results of the identification step were filtered to proteins with an FDR below 1%. Relative label-free quantification (LFQ) was carried out using MaxQuant software V1.6.0.16. All raw files were processed in a single run with default parameters (Cox and Mann 2008; Tyanova et al. 2015). Database searches were performed using Andromeda search engine with the UniProt-SwissProt MusMusculus database as a reference and a contaminants database of common contaminants (Cox et al. 2011). Data processing was performed using Perseus (version 1.6.2.2) with default settings (Tyanova et al. 2016). The LFQ algorithms provide relative quantification of the integrated MS peaks areas from the high resolution MS data. Protein group LFQ intensities were log₂-transformed and the quantitative profiles were filtered for missing values with the following settings: min valid number 2 in at least one group and values greater than 0. To overcome the obstacle of missing LFQ values, missing values were imputed using default parameter, with = 0.3 and down shift = 1.8. Log ratios were calculated as the difference in average log₂ LFQ intensity values between the tested conditions (two-tailed, Student's t-test). A protein was considered statistically significant if its fold change was ≥ 1.5 and $FDR \leq 0.05$.

2.7 STRAP and Cytoscape

Functional categorization analysis of proteins was carried out in Software Tool for Researching Annotations of Proteins (STRAPv1.5). STRAP is a software program developed at the Cardiovascular Proteomics Center of Boston University School of Medicine (Boston, MA). The program annotates a protein list with information that helps in the meaningful interpretation of data from mass spectrometry and other techniques. In this sense, STRAP automatically obtains gene ontology (GO) terms associated with proteins ID results from UniProtKB and EBI GOA databases (Bhatia and Perlman 2010), for this purpose all the proteins entries were introduced in the software and categorized according to biological process, cellular component and molecular function. On the other hand, integrative analysis with Cytoscape was based in the use of ClueGO plug-in. This plug-in strongly improves biological interpretation, once integrates Gene Ontology (GO) terms and KEGG/BioCarta pathways, creating a functionally organized GO/pathway term network (Bindea et al. 2009). ClueGO settings were chosen with the following criteria:

- i. Analysis Mode: defined for ClueGO: function;
- ii. Load Marker List(s): Sample lists were loaded; the organism selected: *Mus musculus*; the type of ids used: Accession ID;
- iii. View Style Settings: All view styles settings (Groups, Clusters and Significance) were used in order to obtain a deep comparison between the different clusters;
- iv. ClueGO settings: The Ontologies/Pathways selected were: GO_BiologicalProcess, KEGG_pathways; All Evidence codes box was chosen; Regarding to network specificity it was set as "medium"; The box of "Use GO Term Fusion" and "Show only pathways with $p \leq 0.05$ " was also chosen.
- v. Advanced Term/Pathway Selection Options: GO Tree Interval it was set: Min Level 3 and Max Level 8; Selection criteria for the terms that have associated genes from cluster 1 it was set as: min 3 genes/term and minimum 4% from

all the Genes associated with the term, the same values were chosen for the cluster, then OR was selected and is specific was set to 60%.

- vi. GO Term/Pathway Network Connectivity (Kappa Score): Medium;
- vii. Statistical Options: Enrichment/Depletion (Two sided hypergeometric test), Correction method: Bonferroni step Down;
- viii. Grouping Options: Use GO Term Grouping (Coloring: Fix; Leading Group Term based on: Highest Significance; Kappa Score selected: grouping with 1 terms in initial group and 50% for groups to merge);
- ix. Preferred Layout: Organic Layout. Then, bottom start to proceed with the analysis.

3. Results

The proteomic study carried out by LC-MS/MS in samples of the liver of mice exposed to toxic metals and selenium after a tryptic digestion with trypsin allowed the identification of approximately 1200 proteins per sample analysed. The LFQ analysis tool was used to demonstrate quantitative differences between studies groups.

3.1 Differentially expressed proteins after metals/selenium exposure

In order to compare among the differentially expressed proteins the common and unique proteins between metals and metals plus selenium versus control group, we create Venn Diagrams using a bioinformatics tool (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn>). When comparing metals group vs control group, a total of 33 exclusive differential proteins are found. On the other hand, when we compared metals plus selenium vs. control group, a total of 94 exclusive differentially expressed proteins were found, of which 22 are common in both groups.

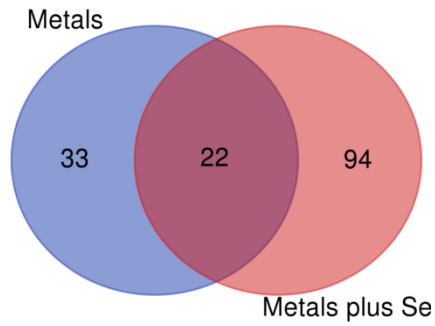


Figure 38. Venn diagrams representing the number of exclusive or common spots for **Metals vs Control group** in comparison with **Metals plus Selenium vs Control group**.

The differential proteins in liver in *Mus musculus* are shown in Table 18, which summarizes the proteins over-expression or inhibition caused by the presence of metals or the combined action of metals plus the protector element selenium.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Protein in Metals group			Protein in Metals+Se			Proteins common in both groups			
Protein IDs	Protein names	Difference*	Protein IDs	Protein names	Difference*	Protein IDs	Protein names	Difference* Metals vs Control	Difference* Metals+Se vs Control
A2ADY9	Protein DDI1 homolog 2	-1.47	A2ATU0	Probable 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component DHKTD1, mitochondrial	-0.49	O35490	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	-1.33	-1.03
A2BIM8	Major urinary protein 6	1.22	O08547	Vesicle-trafficking protein SEC22b	-0.96	P05201	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	-0.91	-0.75
G3X982	Aldehyde oxidase 3	-0.72	O35643	AP-1 complex subunit beta-1	0.60	P15626	Glutathione S-transferase Mu 2	0.73	0.52
O55022	Membrane-associated progesterone receptor component 1	0.81	O35945	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1	1.07	P17717	UDP-glucuronosyltransferase 2B17	0.76	0.82
P00688	Pancreatic alpha-amylase	2.16	O35969	Guanidinoacetate N-methyltransferase	-0.77	P20852	Cytochrome P450 2A5	1.61	0.89
P06909	Complement factor H	-1.28	O55142	60S ribosomal protein L35a	-1.11	P35492	Histidine ammonia-lyase	-1.19	-0.52
P11352	Glutathione peroxidase 1	-0.70	O70503	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	0.87	P61750	ADP-ribosylation factor 4	-1.64	-1.26
P14115	60S ribosomal	-1.63	O88342	WD repeat-containing protein 1	-1.42	P62843	40S ribosomal	-2.72	-1.44

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

protein L27a						protein S15			
P16460	Argininosuccinate synthase	-0.38	O88428	Bifunctional 3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate synthase 2	-1.08	P70195	Proteasome subunit beta type-7	-1.63	-1.38
P24549	Retinal dehydrogenase 1	0.61	P00416	Cytochrome c oxidase subunit 3	2.06	P97494	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	0.62	0.74
P25444	40S ribosomal protein S2	0.49	P01027	Complement C3	0.43	Q62452	UDP-glucuronosyltransferase 1-9	0.86	1.08
P35293	Ras-related protein Rab-18	-1.22	P84244	Histone H3.3	-1.49	Q8CDN6	Thioredoxin-like protein 1	-1.42	-0.83
P35762	CD81 antigen	-1.33	P04247	Myoglobin	1.02	Q8VCC2	Liver carboxylesterase 1	1.13	0.61
P97364	Selenide, water dikinase 2	-1.84	P05213	Tubulin alpha-1B chain	-2.86	Q91V61	Sideroflexin-3	-1.84	-1.95
P99026	Proteasome subunit beta type-4	-1.70	P11725	Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial	-0.48	Q91VI7	Ribonuclease inhibitor	-0.91	-0.57
Q05421	Cytochrome P450 2E1	0.56	P12787	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	-1.96	Q91WG0	Acylcarnitine hydrolase	1.15	1.04
Q5SWU9	Acetyl-CoA carboxylase 1	0.53	P14148	60S ribosomal protein L7	-1.86	Q91WT9	Cystathionine beta-synthase	-0.82	-0.46
Q60766	Immunity-	0.40	P23116	Eukaryotic translation	0.40	Q91XE8	Transmembra	3.25	3.26

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

related GTPase family M protein 1			initiation factor 3 subunit A			ne protein 205			
Q6P8U6	Pancreatic triacylglycerol lipase	1.76	P62855	40S ribosomal protein S26	-2.07	Q9CZU6	Citrate synthase, mitochondrial	0.66	0.50
Q80W21	Glutathione S-transferase Mu 7	-1.63	P35505	Fumarylacetoacetase	-0.41	Q9D379	Epoxide hydrolase 1	0.97	0.89
Q8C7E7	Starch- binding domain- containing protein 1	-1.15	P43274	Histone H1.4	-2.00	Q9DBE0	Cysteine sulfenic acid decarboxylas e	1.30	1.02
Q8VC12	Urocanate hydratase	-0.53	P47962	60S ribosomal protein L5	-1.86	Q9WUZ9	Ectonucleosi de triphosphate diphosphohy drolase 5	0.96	0.70
Q8VC30	Bifunctional ATP- dependent dihydroxyacet one kinase	-0.52	P52792	Glucokinase	-0.93				
Q91V64	Isochorismata se domain- containing protein 1	-1.56	P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	-1.15				
Q91W64	Cytochrome P450 2C70	-0.53	P58771	Tropomyosin alpha-1 chain	-1.28				
Q9CQ92	Mitochondrial fission 1	-1.58	P62075	Mitochondrial import inner membrane	-1.08				

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

protein			translocase subunit Tim13		
Q9CW42	Mitochondrial amidoxime-reducing component 1	-0.43	P62301	40S ribosomal protein S13	-1.79
Q9CZS1	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	-2.05	P62806	Histone H4	-0.77
Q9D8B4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11	1.92	P62821	Ras-related protein Rab-1A	0.85
Q9D7B6	Isobutyryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	-1.46	P62911	60S ribosomal protein L32	-1.62
Q9D8N0	Elongation factor 1-gamma	0.58	P63005	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	-0.67
Q9DBG5	Perilipin-3	-1.18	P68134	Actin, alpha skeletal muscle	0.56
Q9JLJ4	Elongation of very long chain fatty acids protein 2	-1.73	P70349	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	-2.56

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

P84084	ADP-ribosylation factor 5	-1.47
P97328	Ketohexokinase	-0.50
P97457	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	0.56
P99024	Tubulin beta-5 chain	-2.13
Q02053	Ubiquitin-like modifier- activating enzyme 1	0.41
Q283N4	2-oxo-4-hydroxy-4- carboxy-5- ureidoimidazoline decarboxylase	-1.48
Q60605	Myosin light polypeptide 6	-2.19
Q60991	25-hydroxycholesterol 7- alpha-hydroxylase	0.71
Q61578	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial	-0.96
Q61937	Nucleophosmin	-2.17
Q62418	Drebrin-like protein	-0.93
Q64176	Carboxylesterase 1E	0.46
Q64374	Regucalcin	-0.73
Q64FW2	All-trans-retinol 13,14- reductase	1.50
Q6PB66	Leucine-rich PPR motif- containing protein, mitochondrial	0.76
Q6ZWN5	40S ribosomal protein	-0.90

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

S9		
Q7M6Y3	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	1.77
Q8BH95	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	-1.65
Q8BK48	Pyrethroid hydrolase Ces2e	0.65
Q8BVI4	Dihydropteridine reductase	-0.55
Q8JZU2	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	0.41
Q8QZT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	-0.66
Q8R1F5	Putative hydroxypyruvate isomerase	-1.21
Q8R429	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	0.77
Q8VCC2	Liver carboxylesterase 1	0.61
Q91V01	Lysophospholipid acyltransferase 5	1.11
Q91V04	Translocating chain-associated membrane protein 1	0.99
Q91V61	Sideroflexin-3	-1.95
Q91X91	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	-0.74

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	Q91XE4	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase (carboxylate-forming)	-2.06
	Q922D8	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	-0.83
	Q922Q1	Mitochondrial amidoxime reducing component 2	-0.43
	Q99J27	Acetyl-coenzyme A transporter 1	1.19
	Q99JH8	ER lumen protein-retaining receptor 1	1.78
	Q99LY9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	-1.52
	Q99MZ7	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	-0.36
	Q9CQ69	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	-2.79
	Q9CR62	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	0.67
	Q9CYN2	Signal peptidase complex subunit 2	-1.11
	Q9CZB0	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial	1.81
	Q9D2R0	Acetoacetyl-CoA synthetase	-1.23
	Q7TMF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	-1.80

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	Q9D8T7	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	1.13
	Q9DBA8	Probable imidazolonepropionase	-0.86
	Q9DBG1	Sterol 26-hydroxylase, mitochondrial	0.67
	Q9DBG6	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	0.50
	Q9DCD0	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	0.63
	Q9DCG6	Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein 1	-1.89
	Q9DCJ5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	-1.45
	Q9DCT2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	0.53
	Q9EQH2	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	0.61
	Q9EQH3	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	0.64
	Q9JL3	Solute carrier organic anion transporter family member 1B2	0.93
	Q9JL8	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like	-1.06

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	protein		
	Q9QUR6	Prolyl endopeptidase	0.49
	Q9QYY9	Alcohol dehydrogenase 4	-0.56
	Q9R092	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 6	-1.85
	Q9WUM5	Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	-1.92
	Q9WV32	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	-0.96
	Q9WVL0	Maleylacetoacetate isomerase	-0.87
	Q9Z0S1	3(2),5-bisphosphate nucleotidase 1	-1.36

Table 18. Differentially expressed proteins in *Mus musculus* mice under metals and selenium exposure identified by LC-MS/MS.

**Difference is expressed as Log 2 scale*

3.2. Dysregulated biological pathways of differentially expressed proteins.

Integrative analysis with Cytoscape, based on the use of ClueGO plug-in, integrating Gene Ontology (GO) terms and KEGG/BioCarta pathways, were used to improve the biological interpretation and creating a functionally organized GO/pathway term network (Bindea et al. 2009; Bindea et al. 2013). Integrative analysis with Cluego was carried out in both groups (METALS and METALS+Se) in order to get insight of most significant biological process pathways dysregulated by the action of differential proteins. Figure 39 shows the altered pathways under the action of toxic metals and Figure 40 shows the altered biological process pathways under metals plus selenium exposure.

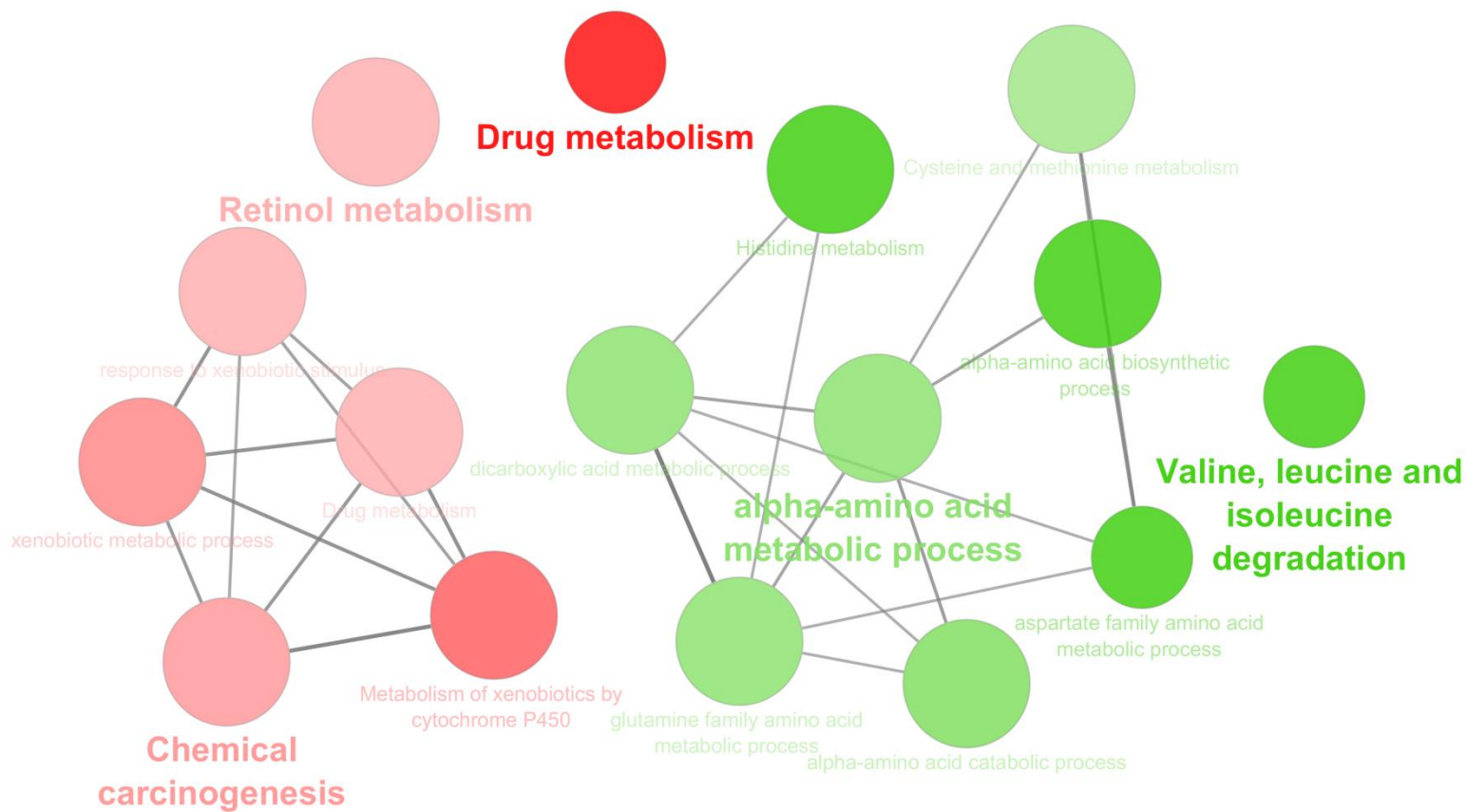


Figure 39. Positively (cluster 1, red circles) and negatively (cluster 2, green circles) expressed biological pathways in metals vs control group based on the analysis on Cluego Plug-in.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

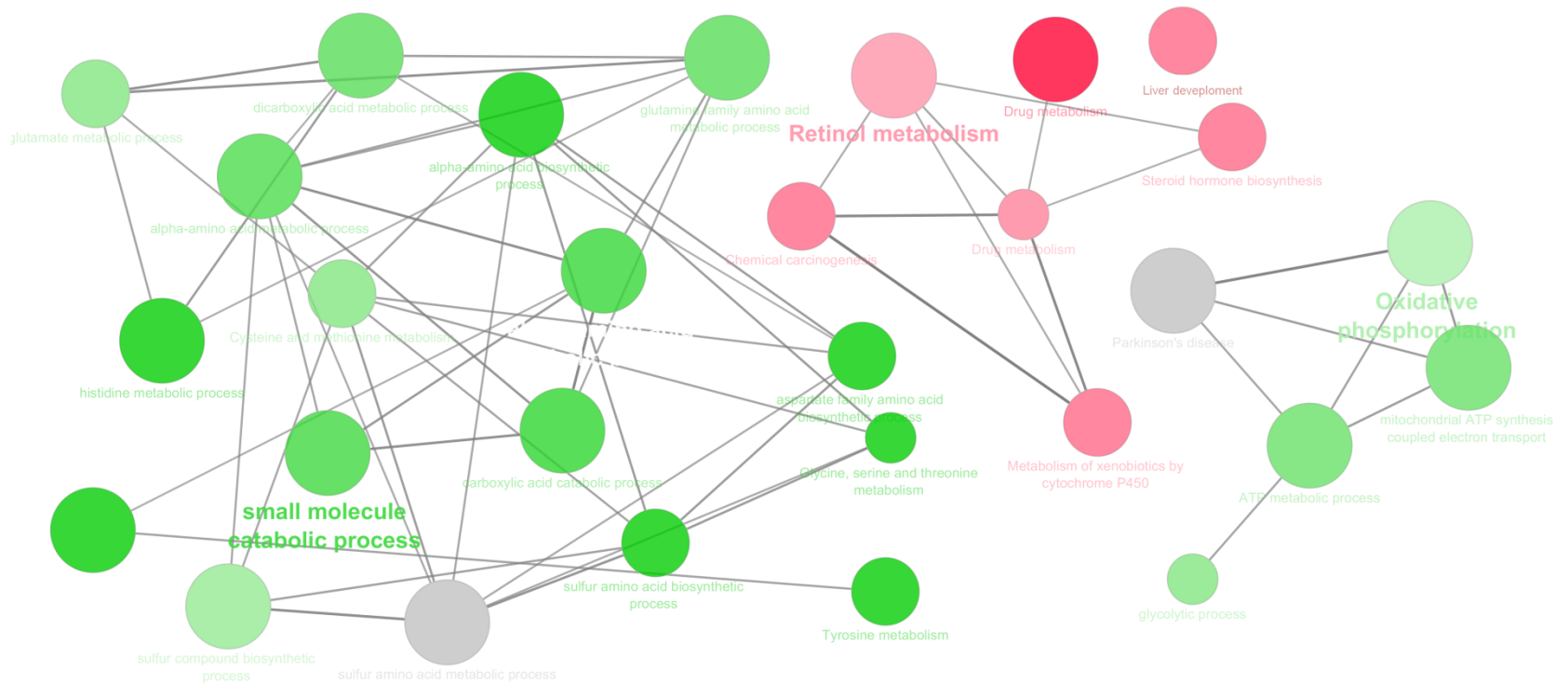


Figure 40. Positively (cluster 1, red circles) and negatively (cluster 2, green circles) expressed biological pathways in metals plus selenium vs control group based on the analysis on Cluego Plug-in. The grey colour represents unspecific terms for these biological pathways, which means that terms from both clusters equally contribute for these biological pathways.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

The altered biological process pathways under metals exposure are shown in the Table 19.

GOTerm	Group PValue	Term PValue	Associated proteins
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1.88E-11	4.03E-08	[Cyp2e1, Ephx1, Gstm2, Ugt1a9, Ugt2b5]
Drug metabolism	1.88E-11	4.84E-08	[Cyp2e1, Gstm2, Ugt1a9, Ugt2b5]
Chemical carcinogenesis	1.88E-11	1.16E-08	[Cyp2e1, Ephx1, Gstm2, Ugt1a9, Ugt2b5]
Response to xenobiotic stimulus	1.88E-11	1.29E-08	[Cyp2e1, Gclc, Gstm2, Ugt1a9]
Xenobiotic metabolic process	1.88E-11	7.54E-06	[Cyp2e1, Gstm2, Ugt1a9]
Cysteine and methionine metabolism	3.24E-10	1.29E-05	[Bhmt, Cbs, Got1]
Histidine metabolism	3.24E-10	5.66E-05	[Aldh1b1, Hal, Uroc1]
Alpha-amino acid metabolic process	3.24E-10	2.24E-10	[Acad8, Ass1, Bhmt, Cbs, Got1, Hal, Sephs2, Uroc1]
Glutamine family amino acid metabolic process	3.24E-10	1.59E-06	[Ass1, Got1, Hal, Uroc1]
Aspartate family amino acid metabolic process	3.24E-10	3.13E-04	[Ass1, Bhmt, Got1]
Alpha-amino acid catabolic process	3.24E-10	1.21E-07	[Acad8, Cbs, Got1, Hal, Uroc1]
Alpha-amino acid biosynthetic process	3.24E-10	9.04E-07	[Ass1, Bhmt, Cbs, Got1, Sephs2]
Retinol metabolism	3.06E-07	3.06E-07	[Aldh1a1, Cyp2a5, Ugt1a9, Ugt2b5]
Drug metabolism	4.85E-04	4.85E-04	[Ces2c, Ugt1a9, Ugt2b5]
Valine, leucine and isoleucine degradation	6.38E-04	6.38E-04	[Acad8, Aldh1b1, Aox3]

Table 19. Altered pathways identified (red boxes: positive; green boxes: negative) based on the use of Cluego plug-in for Cluster analysis of Metals group vs control group.

The altered biological process pathways under metals and selenium exposure are shown in the Table 20.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

GOTerm	Group PValue	Term PValue	Associated proteins
Glycine, serine and threonine metabolism	1.66E-12	2.19E-03	[Bhmt, Cbs, Gamt]
Cysteine and methionine metabolism	1.66E-12	2.59E-04	[Bhmt, Cbs, Got1]
Small molecule catabolic process	1.66E-12	2.42E-12	[Acat1, Adh4, Amdhd1, Cbs, Echs1, Fah, Gck, Got1, Gstz1, Hal, Khk, Otc, Qdpr, Qprt, Urad]
Sulfur compound biosynthetic process	1.66E-12	2.92E-06	[Acat1, Bhmt, Cbs, Mthfd1, Papss2]
Sulfur amino acid metabolic process	1.66E-12	2.48E-06	[Bhmt, Cbs, Mthfd1]
Alpha-amino acid metabolic process	1.66E-12	2.17E-11	[Acat1, Amdhd1, Bhmt, Cbs, Fah, Gamt, Got1, Gstz1, Hal, Mthfd1, Otc, Qdpr]
Carboxylic acid catabolic process	1.66E-12	5.26E-09	[Acat1, Amdhd1, Cbs, Echs1, Fah, Got1, Gstz1, Hal, Otc, Qdpr, Qprt]
Dicarboxylic acid metabolic process	1.66E-12	2.26E-05	[Amdhd1, Got1, Hal, Mthfd1, Qprt]
Histidine metabolic process	1.66E-12	9.05E-06	[Amdhd1, Hal, Mthfd1]
Glutamine family amino acid metabolic process	1.66E-12	4.25E-06	[Amdhd1, Fah, Got1, Hal, Otc]
Sulfur amino acid biosynthetic process	1.66E-12	1.13E-04	[Bhmt, Cbs, Mthfd1]
Alpha-amino acid catabolic process	1.66E-12	7.49E-11	[Acat1, Amdhd1, Cbs, Fah, Got1, Gstz1, Hal, Otc, Qdpr]
Alpha-amino acid biosynthetic process	1.66E-12	2.19E-06	[Bhmt, Cbs, Gamt, Got1, Mthfd1, Otc]
Glutamate metabolic process	1.66E-12	3.48E-05	[Amdhd1, Got1, Hal]
Aspartate family amino acid biosynthetic process	1.66E-12	4.24E-04	[Bhmt, Got1, Mthfd1]
L-phenylalanine catabolic process	1.66E-12	9.05E-06	[Fah, Gstz1, Qdpr]
Tyrosine metabolism	1.27E-10	1.15E-04	[Adh4, Fah, Got1, Gstz1]
Alpha-amino acid catabolic process	1.27E-10	7.49E-11	[Acat1, Amdhd1, Cbs, Fah, Got1, Gstz1, Hal, Otc, Qdpr]
L-phenylalanine catabolic process	1.27E-10	9.05E-06	[Fah, Gstz1, Qdpr]
Steroid hormone biosynthesis	1.45E-10	2.51E-04	[Cyp7b1, Hsd17b12, Ugt1a9, Ugt2b5]
Retinol metabolism	1.45E-10	2.04E-06	[Aldh1a7, Cyp2a5, Retsat, Ugt1a9, Ugt2b5]
Metabolism of	1.45E-10	6.28E-05	[Ephx1, Gstm2, Ugt1a9, Ugt2b5]

xenobiotics by cytochrome P450			
Drug metabolism	1.45E-10	9.29E-04	[Gstm2, Ugt1a9, Ugt2b5]
Chemical carcinogenesis	1.45E-10	3.42E-04	[Ephx1, Gstm2, Ugt1a9, Ugt2b5]
Oxidative phosphorylation	1.96E-08	3.20E-08	[Atp5b, Cox5a, Ndufa12, Ndufa8, Ndufs5, Uqcrcq]
Parkinson's disease	1.96E-08	2.14E-07	[Atp5b, Cox5a, Ndufa12, Ndufa8, Ndufs5, Uqcrcq]
ATP metabolic process	1.96E-08	6.61E-07	[Atp5b, Cox5a, Dhdkd1, Gck, Khk, Ndufa12, Ndufa8, Uqcrcq]
Glycolytic process	1.96E-08	1.10E-03	[Dhdkd1, Gck, Khk]
Mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport	1.96E-08	1.92E-05	[Cox5a, Ndufa12, Ndufa8, Uqcrcq]
Liver development	8.21E-07	8.21E-07	[Aacs, Acat1, Npm1, Otc, Qdpr, Rgn, Rpl32]

Table 20. Altered pathways identified (red boxes: positive; green boxes: negative) based on the use of Cluego plug-in for Cluster analysis of Metals plus Se group vs control group.

4. Discussion

4.1. Common differentially expressed proteins

Among proteins that are differentially significant in both groups (metals and metals+Se), we found proteins involved in the metabolism of xenobiotics. *UDP-glucuronosyltransferase 2B17 (UDPGT)* and *UDP-glucuronosyltransferase 1-9*, which are of major importance in the conjugation and subsequent elimination of potentially toxic xenobiotics (Figure 39 and 40), which are up-regulated in both groups.

Table 18 shows the alteration of proteins involved in the metabolism of amino acids. The level of these proteins is down-regulated by the presence of metals exposure. In this sense, Figures 39 and 40 show inhibition in several pathways related to the metabolism of amino acids. *Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1*, involved in the regulation of homocysteine metabolism which converts betaine and homocysteine to dimethylglycine and methionine, respectively, and are related with transmethylation processes involving S-adenosyl-methionine (SAM) and S-adenosyl-homocysteine

(SAH). In addition, this metabolic cycle is related with methylation processes of metals, such as inorganic arsenic (iAs^{III}) to reduce their toxicity. This protein is inhibited (Difference of -1.03), possibly because the presence of selenium reduces iAs toxicity and consequently the methylation of this species, which is a defence mechanism due to the transformation of iAs to methylated species, MAs^{III} and DMA^V. Moreover, *Aspartate aminotransferase cytoplasmatic* is also altered, which is involved in the biosynthesis of L-glutamate from L-aspartate or L-cysteine, is an important regulator of levels of glutamate, the major excitatory neurotransmitter of the vertebrate central nervous system, that also contributes to the production of L-γ-glutamylcysteine and reduced glutathione (GSH), this latter an important antioxidant agent. The inhibition in the expression of this protein by the presence of selenium (Difference from -0.91 to -0.75), is possibly associated to the reduction of metal-induced oxidative stress induced by selenium; and finally, *Cysteine sulfinic acid decarboxylase*, that catalyzes the decarboxylation of L-aspartate, 3-sulfinic-L-alanine (cysteine sulfinic acid), and L-cysteate to beta-alanine, hypotaurine and taurine, respectively. Decreasing levels of some aminoacids, as taurine and alanine, have been demonstrated by others authors by the exposure to As and Cd (García-Sevillano et al. 2014d). However, the difference between the levels of these proteins between Metals+Se group against control is lower than that in the group Metals against control, which could indicate the possible antagonistic effect of Se when this is administered together with metals (see difference in table 18).

Alteration of proteins involved in the synthesis of intermediate compounds of the Krebs cycle, such as *Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit* and *Glutathione S-transferase Mu 2*, implicated in the synthesis of glutathione. The level of both proteins is up-regulated by the presence of toxic metals without and with selenium. Moreover, Table 18 shows up-regulating levels of *Citrate synthase mitochondrial* that is involved in a subpathway that synthesizes isocitrate from oxaloacetate. This subpathway is part of the tricarboxylic acid cycle pathway, which is itself part of Carbohydrate metabolism.

Previous research carried out by other authors also showed an increase in the level of metabolites related to the Krebs cycle in *Mus musculus* mice exposed to arsenic (Garcia-Sevillano et al. 2013) and has been related with the synthesis of glutathione (GSH). On the other hand, this study shows alteration in the lipid metabolism due to the differential expression of acylcarnitine hydrolase. *Acylcarnitine hydrolase* expression was up-regulated in mice exposed to metals and metals plus selenium. These findings are consistent with previous studies that found increased activities of different enzymes involved in this biochemical pathway as a consequences of toxic induced by pollutants (Tan et al. 2012; Abril et al. 2015). The difference in the level of expression of this protein is lower in the mice exposed to metals plus selenium than in mice only exposed to the metal cocktail.

Moreover, it can be mentioned the down-regulation of *Histidine ammonia-lyase*. Hystidine has many systemic functions in the body, such as the removing of surplus heavy metals and the increase of cancer drugs effectiveness. The inhibition of *Histidine ammonia-lyase* by the exposure to metals, Dif. -1.19, is reduced by the presence of selenium, Dif. -0.52, which denotes the beneficial effect of this element.

Finally, it is observed altered level of *cytochrome P450 (CYPs)*. CYPs are proteins of the superfamily containing heme as a cofactor and, therefore, are hemeoproteins. They are, in general, the terminal oxidase enzymes in electron transfer chains, broadly categorized as P450-containing systems. Most CYPs require a protein partner to deliver one or more electrons to reduce the iron (and eventually molecular oxygen). The most common reaction catalyzed by cytochromes P450 is a monooxygenase reaction, e.g., insertion of one atom of oxygen into the aliphatic position of an organic substrate (RH), while the other oxygen atom is reduced to water. These proteins are, therefore, frequently involved in antioxidative processes, this fact explain the high positive value in *Cytochrome P450 2A5* (Difference=1.61) that reflects a clear over-expression of this protein as a consequence of oxidative stress caused by the input of toxic metals, this value of Difference decrease to 0.89 in

the presence of selenium, due to the protective effect of this element. The figures 39 and 40 show an overexpression in the metabolism of xenobiotics by cytochrome P450.

4.2. Differentially expressed proteins in Metals group

When we compared METALS group vs CONTROL, a total of 55 proteins are significantly differentiated, and 33 proteins are exclusive for this group. The Table 18 shows a decrease in the level of *Glutathione peroxidase 1 (GPX1)*. GPX1 is the major antioxidant enzyme that catalyzes the GSH dependent removal of H₂O₂ and lipo hydroperoxides (Montes-Nieto et al. 2007). Glutathione peroxidases (GPx) are a family of antioxidant enzymes whose main function is to counteract the adverse effect of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides in the intracellular and extracellular components (Papp et al. 2007). They protect the hemoglobin in erythrocytes from oxidative breakdown. So, the lower levels found of GPX1 suggests a high consumption of this protein to counteract the breakdown by the toxic action of metals contaminants.

On the other hand, *Complement Factor H* is up-regulated by the exposure to metals in mice. This glycoprotein plays an essential role in maintaining a well-balanced immune response by modulating complement activation. In addition, this protein mediates several cellular responses through interaction with specific receptors. For example, interacts with CR3/ITGAM receptor and thereby mediates the adhesion of human neutrophils to different pathogens. In turn, these pathogens are phagocytosed and destroyed.

Moreover, the table 18 shows up-regulated levels in proteins implicated in fatty acids metabolism. *Acetyl-coA carboxylase 1 (ACC)*, which catalyzes the rate-limiting reaction in the biogenesis of long-chain fatty acids. The function of ACC is to regulate the metabolism of fatty acids (Tong 2005). When the enzyme is active, the product, malonyl-CoA, is produced which is a building block for new fatty acids and can inhibit

the transfer of the fatty acyl group from acyl CoA to carnitine with carnitine acyltransferase, which inhibits the beta-oxidation of fatty acids in the mitochondria. Also, *Pancreatin triacylglycerol lipase*, that plays an important role in fat metabolism. It preferentially splits the esters of long-chain fatty acids at positions 1 and 3, producing mainly 2-monoacylglycerol and free fatty acids. Increase in the level of fatty acids have been demonstrated by other authors by the exposure to As (Garcia-Sevillano et al. 2013), Hg (García-Sevillano et al. 2014b) and Cd (García-Sevillano et al. 2015a).

On the other hand, *Starch-binding domain-containing protein 1* is down-regulated in mice exposure to metals (Table 18). This protein acts as a cargo receptor for glycogen. Glycogen is an energy reserve polysaccharide abundant in the liver involved in glycogenolysis for the production of glucose. The lower levels of *Starch-binding domain-containing protein 1* could indicate a higher consumption of this protein for the production of glucose to form glycogen. This fact suggests the mobilization of energy reserves to meet organism needs under unfavourable condition, for example of glycogenolysis mechanism, which has been previously reported by others authors under the action metal pollutants (Cappello et al. 2013; Wu et al. 2013; Ji et al. 2015).

Finally, results show alteration in proteins implicated in respiratory chain. Up-regulated *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11*, which is an accessory subunit of the mitochondrial membrane respiratory chain NADH dehydrogenase (Complex I). Complex I functions in the transfer of electrons from NADH to the respiratory chain. The difference of level of this protein (Table 18) between mice exposed to metals and control is relatively high, which could indicate the demand for a high amount of this protein to be able to carry out respiration chain.

In addition, *Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)* with a Difference of 0.56 (Table 18), is involved in the metabolism of xenobiotics in the body. The figure 39 shows an increase in the activity of metabolism of Cytochrome P450. This class of enzymes is divided up into a number of subcategories, including CYP1, CYP2, and CYP3, which

as a group are largely responsible for the breakdown of foreign compounds in mammals (Lewis et al. 2003).

4.3. Differentially expressed proteins in Metals+Se group

When we compare METALS+Se group vs CONTROL, a total of 94 exclusive proteins are found in this group. Increased level of *myoglobin* is found in mice exposed to metals and Se. Myoglobin serves as a reserve supply of oxygen and facilitates the movement of oxygen within muscles. The increased level of this protein in this group may be favored by the presence of selenium.

Decreased level of *tubulin alpha-1B chain* and *tubulin beta-5 chain*. Tubulin, a heterodimer of α and β subunits, is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP (guanosine triphosphate), one at an exchangeable site on the beta chain and one at a non-exchangeable site on the alpha chain. Tubulin is oxidatively modified by ROS to form disulphide bridges, which are responsible for the inhibition of microtubule polymerization. These proteins as other cytoskeletal proteins, acts as a redox buffer to protect sensitive biomolecules form oxidative damage (Landino et al. 2004). The down-regulated levels of these proteins suggest the antioxidant role of Se.

The level of *Liver carboxylesterase 1* and *carboxylesterase 1E* is increased in the group exposed to metals plus selenium. Both proteins are involved in the detoxification of xenobiotics. The presence of selenium could stimulate the increase of activity of this protein. In this sense, the figure 40 shows alteration in the liver metabolism.

Moreover, the table 18 shows up-regulated *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1*, which is a key regulator of striated muscle performance by acting as the major Ca^{2+} ATPase, responsible for the reuptake of cytosolic Ca^{2+} into the sarcoplasmic reticulum. This protein catalyzes the hydrolysis of ATP coupled with the translocation of calcium from the cytosol to the sarcoplasmic reticulum lumen, contributing to calcium sequestration involved in muscular excitation/contraction. This

fact is in accordance with the analysis of metabolic pathways (Figure 40), in which we can observe an increase in ATP metabolic process.

On the other hand, up-regulated *Lysophospholipid acyltransferase 5* is found in metals plus selenium exposed mice. This protein is involved in the phospholipid metabolism pathway, which mediates the conversion of lysophosphatidylcholine (LPC) into phosphatidylcholine (PC). Phosphatidylcholines are the most abundant phospholipids in cellular membranes with levels ranging from 60 to 80 % of total phospholipids (Skipski et al. 1967). PCs join in pathological mechanisms and important cellular functions such as signal transduction, apoptosis, necrosis, and protein sorting (Koivusalo et al. 2001; Bashir et al. 2006). Previous investigations have associated the increased level of LPCs to the rupture of cell membrane after drug exposure (Griffin et al. 2001). The increased level of *Lysophospholipid acyltransferase 5* could be stimulated by the presence of selenium that regenerate the broken plasma membrane, due to the action of toxic metals.

Moreover, in Table 18 are shown the alterations in proteins involved in Krebs cycle, *succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha mitochondrial*, involved in step 1 of the subpathway that synthesizes succinate from succinyl-CoA, coupling the hydrolysis of succinyl-CoA to the synthesis of either ATP or GTP; *Tricarboxylate transport protein mitochondrial*, involved in citrate-H⁺/malate exchange; *mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein*, which catalyzes the transport of 2-oxoglutarate across the inner mitochondrial membrane in an electroneutral exchange for malate or other dicarboxylic acids; *2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component DHKTD1 mitochondrial*, which is a complex that catalyzes the overall conversion of 2-oxoglutarate to succinyl-CoA and CO₂; *Fumarylacetoacetase*, that is involved in a step of the subpathway that synthesizes acetoacetate and fumarate from L-phenylalanine. The level of these proteins is down-regulated in mice exposed to metals plus selenium.

5. Conclusions

This work illustrates the successful application of nanoLC-MS/MS protein separation and identification of protein to evaluate the biological effects of toxic metals in *Mus musculus* mice and the antagonistic effect of selenium. Our study reveals clear differences between the proteome of animals exposed to toxic metals and metals plus selenium, with specific increases and decreases in selected groups of proteins. Identified proteins were sorted into different cell functions: oxidative stress, fatty acid, amino acid, Krebs cycle, and energy transport among others. The protective effect of selenium against toxic metals could be explained by the regulation of metabolic pathways. Also, the integrative analysis with Cluego allowed gaining deeper insight into the biological processes driving the metals under selenium exposure.

References

- Abril N, Chicano-Gálvez E, Michán C, Pueyo C, López-Barea J (2015) iTRAQ analysis of hepatic proteins in free-living *Mus spretus* mice to assess the contamination status of areas surrounding Doñana National Park (SW Spain). *Sci Total Environ* 523:16–27 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.116
- Araújo JE, Oliveira E, Otero-Glez A, Santos Nores J, Igrejas G, Lodeiro C, Capelo JL, Santos HM (2014) A comprehensive factorial design study of variables affecting protein extraction from formalin-fixed kidney tissue samples. *Talanta* 119:90–97 . doi: 10.1016/j.talanta.2013.10.019
- Barbosa F (2017) Toxicology of metals and metalloids: Promising issues for future studies in environmental health and toxicology. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues* 80:137–144 . doi: 10.1080/15287394.2016.1259475
- Bashir S, Sharma Y, Irshad M, Gupta SD, Dogra TD (2006) Arsenic-induced cell death in liver and brain of experimental rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98:38–43 . doi: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto_170.x

Bhatia VN, Perlman DH (2010) Software Tool for Researching Annotations of Proteins (STRAP): Open-Source Protein Annotation Software with Data Visualization. 81:9819–9823 . doi: 10.1021/ac901335x.Software

Bindea G, Galon J, Mlecnik B (2013) CluePedia Cytoscape plugin: Pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* 29:661–663 . doi: 10.1093/bioinformatics/btt019

Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman WH, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J (2009) ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25:1091–1093 . doi: 10.1093/bioinformatics/btp101

Cappello T, Mauceri A, Corsaro C, Maisano M, Parrino V, Lo Paro G, Messina G, Fasulo S (2013) Impact of environmental pollution on caged mussels *Mytilus galloprovincialis* using NMR-based metabolomics. *Mar Pollut Bull* 77:132–139 . doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.10.019

Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26:1367–1372 . doi: 10.1038/nbt.1511

Cox J, Matic I, Hilger M, Nagaraj N, Selbach M, Olsen J V., Mann M (2009) A practical guide to the maxquant computational platform for silac-based quantitative proteomics. *Nat Protoc* 4:698–705 . doi: 10.1038/nprot.2009.36

Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen J V., Mann M (2011) Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res* 10:1794–1805 . doi: 10.1021/pr101065j

Gao X, Zhang Q, Meng D, Isaac G, Zhao R, Fillmore TL, Chu RK, Zhou J, Tang K, Hu Z, Moore RJ, Smith RD, Katze MG, Metz TO (2012) A reversed-phase capillary ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) method for

comprehensive top-down/bottom-up lipid profiling. *Anal Bioanal Chem* 402:2923–2933 . doi: 10.1007/s00216-012-5773-5

García-Barrera T, Rodríguez-Moro G, Callejón-Leblic B, Arias-Borrego A, Gómez-Ariza JL (2018) Mass spectrometry based analytical approaches and pitfalls for toxicometabolomics of arsenic in mammals: A tutorial review. *Anal Chim Acta* 1000:41–66 . doi: 10.1016/j.aca.2017.10.019

García-Sevillano MA, Abril N, Fernández-Cisnal R, García-Barrera T, Pueyo C, López-Barea J, Gómez-Ariza JL (2015a) Functional genomics and metabolomics reveal the toxicological effects of cadmium in *Mus musculus* mice. *Metabolomics*. doi: 10.1007/s11306-015-0801-z

García-Sevillano MÁ, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL (2015b) Environmental metabolomics: Biological markers for metal toxicity. *Electrophoresis* 36: . doi: 10.1002/elps.201500052

García-Sevillano MA, Rodríguez-Moro G, García-Barrera T, Navarro F, Gómez-Ariza JL (2015c) Biological interactions between mercury and selenium in distribution and detoxification processes in mice under controlled exposure. Effects on selenoprotein. *Chem Biol Interact* 229:82–90 . doi: 10.1016/j.cbi.2015.02.001

García-Sevillano MÁ, García-Barrera T, Abril N, Pueyo C, López-Barea J, Gómez-Ariza JL (2014a) Omics technologies and their applications to evaluate metal toxicity in mice *M. spretus* as a bioindicator. *J Proteomics* 104:4–23 . doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.032

García-Sevillano MA, García-Barrera T, Navarro F, Gailer J, Gómez-Ariza JL (2014b) Use of elemental and molecular-mass spectrometry to assess the toxicological effects of inorganic mercury in the mouse *Mus musculus*. *Anal Bioanal Chem* 406:5853–65 . doi: 10.1007/s00216-014-8010-6

García-Sevillano MA, García-Barrera T, Navarro F, Gómez-Ariza JL (2014c) Cadmium toxicity in *Mus musculus* mice based on a metallomic study. *Antagonistic interaction*

between Se and Cd in the bloodstream. *Metallomics* 6:672–81 . doi: 10.1039/c3mt00350g

García-Sevillano MT, García-Barrera T, Navarro-Roldán F, Montero-Lobato Z, Gómez-Ariza JL (2014d) A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under arsenic/cadmium exposure. *J Proteomics* 104: . doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.011

García-Sevillano M a, García-Barrera T, Navarro F, Gómez-Ariza JL (2013) Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As₂O₃ based on integrated -omics approaches. *Metallomics* 5:1644–1655 . doi: 10.1039/C3MT00186E

García-Sevillano MA, González-Fernández M, Jara-Biedma R, García-Barrera T, López-Barea J, Pueyo C, Gómez-Ariza JL (2012) Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 404:1967–81 . doi: 10.1007/s00216-012-6274-2

Gómez-Ariza JL, Jahromi EZ, González-Fernández M, García-Barrera T, Gailer J (2011) Liquid chromatography-inductively coupled plasma-based metallomic approaches to probe health-relevant interactions between xenobiotics and mammalian organisms. *Metallomics* 3:566–77 . doi: 10.1039/c1mt00037c

González-Fernández M, García-Sevillano MA, Jara-Biedma R, García-Barrera T, Vioque A, López-Barea J, Pueyo C, Gómez-Ariza JL (2011) Size characterization of metal species in liver and brain from free-living (*Mus spretus*) and laboratory (*Mus Musculus*) mice by SEC-ICP-MS: Application to environmental contamination assessment. *J Anal At Spectrom* 26:141–149 . doi: 10.1039/C0JA00127A

Goyer RA (2001) Toxic effects of metals. In: Klaassen CD (ed) *Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons*. pp 811–867

Griffin JL, Walker L, Shore RF, Nicholson JK (2001) High-resolution magic angle spinning 1H-NMR spectroscopy studies on the renal biochemistry in the bank vole (*Clethrionomys*

glareolus) and the effects of arsenic (As³⁺) toxicity. *Xenobiotica* 31:377–85 . doi: 10.1080/00498250110055938

Hodson P V. (2002) Biomarkers and Bioindicators in monitoring and assessment. In: Adams SM (ed) Biological indicators of aquatic ecosystems stress. American Fisheries Society, Maryland, U.S.A., pp 591–619

Ji C, Cao L, Li F (2015) Toxicological evaluation of two pedigrees of clam *Ruditapes philippinarum* as bioindicators of heavy metal contaminants using metabolomics. *Environ Toxicol Pharmacol* 39:545–54 . doi: 10.1016/j.etap.2015.01.004

Koivusalo M, Haimi P, Heikinheimo L, Kostianen R, Somerharju P (2001) Quantitative determination of phospholipid compositions by esi-ms: Effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response. *J Lipid Res* 42:663–672

Landino LM, Moynihan KL, Todd J V., Kennett KL (2004) Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem Biophys Res Commun* 314:555–560 . doi: 10.1016/j.bbrc.2003.12.126

Lewis DFV, Lake BG, Dickins M, Ueng YF, Goldfarb PS (2003) Homology modelling of human CYP1A2 based on the CYP2C5 crystallographic template structure. *Xenobiotica* 33:239–254 . doi: 10.1080/0049825021000048791

Montes-Nieto R, Fuentes-Almagro CA, Bonilla-Valverde D, Prieto-Alamo M-J, Jurado J, Carrascal M, Gómez-Ariza JL, López-Barea J, Pueyo C (2007) Proteomics in free-living *Mus spretus* to monitor terrestrial ecosystems. *Proteomics* 7:4376–87 . doi: 10.1002/pmic.200700409

Morales-Prieto N, Ruiz-Laguna J, Abril N (2018) Dietary Se supplementation partially restores the REDOX proteomic map of *M. spretus* liver exposed to p,p'-DDE. *Food Chem Toxicol* 114:292–301 . doi: 10.1016/j.fct.2018.02.047

Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R (2009) Metallomics: the concept and methodology.

Chem Soc Rev 38:1119–38 . doi: 10.1039/b713633c

Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK (2007) From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. *Antioxid Redox Signal* 9:775–806 . doi: 10.1089/ars.2007.1528

Pollack AZ, Mumford SL, Mendola P, Perkins NJ, Rotman Y, Wactawski-Wende J, Schisterman EF (2015) Kidney biomarkers associated with blood lead, mercury, and cadmium in premenopausal women: A prospective cohort study. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues* 78:119–131 . doi: 10.1080/15287394.2014.944680

Sanchez BC, Ralston-Hooper K, Sepúlveda MS (2011) Review of recent proteomic applications in aquatic toxicology. *Environ Toxicol Chem* 30:274–282 . doi: 10.1002/etc.402

Skipski VP, Barclay M, Barclay RK, Fetzer VA, Good JJ, Archibald FM (1967) Lipid composition of human serum lipoproteins. *Biochem J* 104:340–352

Tainer JA, Roberts VA, Getzoff ED (1991) Metal-binding sites in proteins. *Curr Opin Biotechnol* 2:582–591 . doi: 10.1016/0958-1669(91)90084-I

Tan F, Jin Y, Liu W, Quan X, Chen J, Liang Z (2012) Global liver proteome analysis using iTRAQ labeling quantitative proteomic technology to reveal biomarkers in mice exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Environ Sci Technol* 46:12170–12177 . doi: 10.1021/es3027715

Tong L (2005) Acetyl-coenzyme A carboxylase: Crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Mol Life Sci* 62:1784–1803 . doi: 10.1007/s00018-005-5121-4

Tyanova S, Temu T, Carlson A, Sinitcyn P, Mann M, Cox J (2015) Visualization of LC-MS/MS proteomics data in MaxQuant. *Proteomics* 15:1453–1456 . doi: 10.1002/pmic.201400449

Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13:731–740 . doi: 10.1038/nmeth.3901

Wu H, Liu X, Zhang X, Ji C, Zhao J, Yu J (2013) Proteomic and metabolomic responses of clam *Ruditapes philippinarum* to arsenic exposure under different salinities. *Aquat Toxicol* 136–137:91–100 . doi: 10.1016/j.aquatox.2013.03.020

6. CONCLUSIONES

Conclusions



6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los diversos estudios desarrollados en la presente tesis doctoral permiten establecer las siguientes conclusiones:

- i. Los organismos modelos usados en esta tesis para el estudio de la contaminación provocada por contaminantes orgánicos e inorgánicos, son buenos bioindicadores para evaluar la respuesta biológica frente a este tipo de contaminación. Además, se ha demostrado la idoneidad de los tejidos biológicos estudiados en cada caso (fundamentalmente la glándula digestiva en el bivalvo *Scrobicularia plana*; y riñón e hígado en los ratones *Mus musculus* y *Mus spretus*) para obtener una respuesta más adecuada frente a la contaminación.
- ii. Las experiencias de exposición llevadas a cabo en los distintos organismos modelo a los diferentes tipos de contaminantes (As en el bivalvo *Scrobicularia plana*; DDE/Se en *Mus Spretus*; y por último Cd/Se y Cd/As/Hg/Se en *Mus Musculus*) se han desarrollado correctamente durante el período de tiempo establecido en los diseños de exposición, lo que indica la idoneidad de los valores de LD50 revisados, utilizados en las experiencias realizadas, sobre la base de la bibliografía para este tipo de compuestos.
- iii. La aplicación de metodologías analíticas complementarias, metalómica/ionómica/proteómica/metabolómica, ha permitido obtener una visión más completa de los procesos biológicos que se producen en los organismos vivos como consecuencia de la contaminación, tanto a contaminantes orgánicos como inorgánicos.
- iv. Se ha desarrollado un procedimiento metabolómico complementario basado en el uso combinado de la espectrometría de masas de alta resolución

introduciendo la muestra mediante infusión directa (DI-ESI-QqQ-TOF-MS) y la cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS) en extractos de glándula digestiva del bivalvo *Scrobicularia plana* que ha permitido evaluar zonas sometidas a diferente contaminación en el estuario del Río Guadalquivir. Este estudio muestra la identificación de metabolitos relacionados con estrés medioambiental en la zona de mayor contaminación, como estrés oxidativo, metabolismo de la energía, hiperlipidemia o β -oxidación entre otros. Este estudio muestra el alto potencial de las plataformas metabolómicas para los estudios de contaminación ambiental.

- v. La aplicación de un procedimiento metalómico desarrollado mediante el acoplamiento de la cromatografía de intercambio iónico (AEC) con un sistema de detección atómica ICP-MS, para la caracterización de diferentes metalobiomoléculas de As en la glándula digestiva del bivalvo *Scrobicularia plana* tras la exposición a As inorgánico, mostró la presencia de una alta concentración de AsB en dicho tejido, lo que indica que dicho organismo posee poderosos sistemas de detoxificación que transforma posibles formas tóxicas de este elemento en AsB inocua. Además, dicho estudio fue complementado con un análisis metabolómico mediante DI-ESI-QqQ-TOF-MS permitiendo la identificación de metabolitos alterados tras la exposición de este elemento, como un aumento en el nivel de homocisteína, la cual está implicada en el ciclo de metilación del As inorgánico, lo que constituye una prueba más a favor de los mecanismos de detoxificación de este organismo en respuesta a la exposición a As.
- vi. Se han evaluado la interacción antagonista del Se frente a los efectos tóxicos de elementos tóxicos en el ratón de laboratorio *Mus musculus* y el ratón de vida libre *Mus Spretus* utilizando distintos enfoques ómicos:

- a. La aplicación de un procedimiento ionómico en combinación con dos plataformas metabolómicas (DI-ESI-QqQ-TOF-MS y GC-MS), para la identificación de alteraciones metabólicas y el tráfico de metales entre diferentes órganos, causado por la interacción antagonista de cadmio y selenio. El uso de la espectrometría de masas orgánica e inorgánica ha demostrado el potencial del uso combinado de la espectrometría de masas molecular (DI-ESI-QqQ-TOF-MS y GC-MS) y elemental (ICP-ORS-MS) para la identificación de alteraciones metabólicas y el tráfico de metales entre diferentes órganos. Además, este estudio demuestra una redistribución de metales a órganos con mayor actividad metabólica, como por ejemplo el hígado cuando Cd es administrado junto con Se. Por otro lado, los resultados metabolómicos muestran alteraciones en metabolitos implicados en diferentes rutas metabólicas, como metabolismo de la energía, metabolismo de aminoácidos, β oxidación de ácidos grasos o apoptosis celular. Además, el nivel de algunos de estos metabolitos se modula cuando los ratones son expuestos a Se junto con Cd, lo que demuestra el posible efecto protector del Se frente a este elemento.

- b. La combinación de plataformas metabolómicas complementarias basadas en la infusión directa (DI) y la cromatografía de gases (GC) a un espectrómetro de masas aplicadas a muestras de hígado y riñón de ratones, los cuáles han demostrado ser importante órganos diana de agentes contaminantes, tras la exposición a DDE y Se, muestra el potencial de estas técnicas para una rápida evaluación de los efectos toxicológicos de los cócteles químicos. Además, el análisis de los extractos polares y lipofílicos utilizando modo de ionización positivo y negativo permite la caracterización de un

mayor número de posibles biomarcadores en respuesta a cócteles químicos.

- c. El estudio proteómico llevado a cabo mediante el acoplamiento nanoLC-ESI-TOF-MS/MS en muestras de hígado de ratón expuesto a cóctel de metales tóxicos (As, Cd y Hg) y Se después de una digestión trípica ha permitido la identificación de aproximadamente 1200 proteínas por muestra analizada. El análisis de las proteínas identificadas ha permitido, mediante la herramienta Cytoscape, la identificación y comparación de los procesos biológicos perturbados por la acción de estos elementos tóxicos cuando se administran sin Se o cuando son administrados con este elemento protector.

- vii. Como conclusión global, podemos destacar el potencial uso combinado de estas técnicas ómicas para el estudio de ensayos de exposición a contaminantes en vertebrados e invertebrados, dilucidación de la distribución de metales entre los diversos órganos, interacciones entre elementos, homeostasis y alteraciones metabólicas asociadas. Por tanto, se puede concluir, que estas técnicas ofrecen grandes posibilidades para llevar a cabo estudios de contaminación ambiental.

CONCLUSIONS

The results obtained in the different studies developed in this doctoral thesis allow establishing the following conclusions:

- i. The model organisms used in this doctoral thesis to study the contamination of organic and inorganic contaminants are good bioindicators to evaluate the biological response to this type of contamination. In addition, the results obtained demonstrated the suitability of biological tissues studied in each case (digestive gland in the bivalve *Scrobicularia plana*; and kidney and liver in mice *Mus musculus* and *Mus spretus*) to obtain an adequate response to pollution.
- ii. Experimental exposures carried out in different model organisms to different types of contaminants (As in the bivalve *Scrobicularia plana*; DDE/Se in *Mus Spretus*; and finally Cd/Se and Cd/As/Hg/Se in *Mus Musculus*) have been performed according to established time in the exposure designs, which are based on adjusted LD50 values reviewed in the literature for the different types of compounds, providing successful results.
- iii. The application of complementary analytical methodologies, metallomics/ionomics/proteomics/metabolomics, has allowed to obtain a more complete vision of the biological processes that occur in living organisms as a consequence of contamination of both organic and inorganic contaminants.
- iv. It has been performed a complementary metabolomic procedure based on the combined use of high resolution mass spectrometry with sample introduction by direct infusion (DI-ESI-QqQ-TOF-MS) and gas

chromatography with mass detector (GC-MS) using extracts of the digestive gland of the bivalve *Scrobicularia plana* that has allowed to evaluate areas suffering different contamination in the estuary of the Guadalquivir River. This study shows alteration of metabolites related to environmental stress in the area of higher contamination, such as oxidative stress, energy metabolism, hyperlipidemia or β -oxidation among others. So, this study shows the high potential of metabolomic platforms for studies of environmental pollution.

- v. A metallomic procedure based on the coupling of ion exchange chromatography (AEC) with an atomic detection system involving ICP-MS for the characterization of different metallobiomolecules of As in the digestive gland of the bivalve *Scrobicularia plana* after As inorganic exposure. This study showed the presence of a high concentration of AsB in this tissue, which is a less toxic compound than the inorganic species of this element. In addition, this study was complemented with a metabolomic analysis by DI-ESI-QqQ-TOF-MS allowing the identification of altered metabolites after exposure of this element, such as an increase in the level of homocysteine, which is involved in the cycle of methylation of the inorganic As, which could be indicative of a process of detoxification of this organism in response to As exposure.
- vi. The antagonistic interaction of Se against the toxic effects of few elements in the *Mus musculus* laboratory mice and the free-living mouse *Mus Spretus* have been evaluated using different omics approaches:
 - a. The application of an ionomic procedure in combination with two metabolomic platforms (DI-ESI-QqQ-TOF-MS and GC-MS) for the identification of metabolic alterations and metal trafficking between different organs, caused by the antagonist interaction of cadmium

and selenium, using organic and inorganic mass spectrometry has demonstrated the potential of combined use of both molecular mass spectrometry (DI-ESI-QqQ-TOF-MS and GC-MS) and elemental (ICP-ORS-MS), for the identification of metabolic alterations and the traffic of metals between different organs. In addition, this study demonstrates the existence of a redistribution of metals among the organs with higher metabolic activity, such as the liver when Cd is administered together with Se. On the other hand, the metabolomic results show alterations in metabolites involved in different metabolic pathways, such as energy metabolism, amino acid metabolism, β fatty acid oxidation or cellular apoptosis. In addition, the level of some metabolites is regularized when the mice are exposed to Se together with Cd, which demonstrates the potential protective effect of Se against this element.

- b. The combination of complementary metabolomic platforms based on direct infusion (DI) and gas chromatography (GC) to a mass spectrometer applied to samples of liver and kidney of mice, which have been shown to be important target organs for contaminants, after exposure to DDE and Se, shows the potential of these techniques for rapid evaluation of the toxicological effects of chemical cocktails. In addition, the analysis of polar and lipophilic extracts using positive and negative ionization mode allows the characterization of a higher number of possible biomarkers in response to chemical cocktails exposure.
- c. The proteomic study carried out by using the coupling nanoLC-ESI-TOF-MS/MS to samples of mice liver exposed to toxic metal cocktails (As, Cd and Hg) and Se after tryptic digestion has allowed

CONCLUSIONES

the identification of approximately 1200 proteins per sample analyzed. The analysis of the identified proteins has allowed, with the use of Cytoscape software, the identification and comparison of the biological processes disturbed by the action of these toxic elements when they are administered with or without Se.

- vii. As a final conclusion, it can be highlighted the potential of the combined use of these *omic* techniques for the study of exposure experiments to pollutants in vertebrates and invertebrates, elucidation of the metal distribution among different organs, interactions between elements, homeostasis and associated metabolic alterations. Therefore, it can be concluded that the possibilities of these techniques for environmental studies are demonstrated, opening great possibilities in this field of study.